



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA CELULAR

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO MOLECULAR DE GENES IMPLICADOS EN
HIPOACUSIA NO SINDRÓMICA AUTOSÓMICA
RECESIVA MEDIANTE SECUENCIACIÓN
SANGER Y DE NUEVA GENERACIÓN**

MARÍA DOMÍNGUEZ RUIZ

MADRID, 2015

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Estudio Molecular de Genes Implicados en Hipoacusia No
Sindrómica Autosómica Recesiva Mediante Secuenciación
Sanger y de Nueva Generación

Memoria para optar al título de Doctor
presentada por María Domínguez Ruiz
Licenciada en Biología
en la Universidad Autónoma de Madrid

Director de tesis
Dr. Ignacio del Castillo Fernández del Pino
Servicio de Genética
Hospital Ramón y Cajal



Hospital Universitario
Ramón y Cajal
 Comunidad de Madrid



Fundación para la Investigación Biomédica
del Hospital Universitario Ramón y Cajal

Don Ignacio del Castillo Fernández del Pino, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador del Servicio de Genética del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

CERTIFICA QUE:

Doña **María Domínguez Ruiz** ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “ESTUDIO MOLECULAR DE GENES IMPLICADOS EN HIPOACUSIA NO SINDRÓMICA AUTOSÓMICA RECESIVA MEDIANTE SECUENCIACIÓN SANGER Y DE NUEVA GENERACIÓN”

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 30 de octubre de 2015

Fdo. Dr. Ignacio del Castillo Fernández del Pino
Director de Tesis
Servicio de Genética
Hospital Ramón y Cajal

Doña Begoña Fernández Calvin, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA QUE:

Doña **María Domínguez Ruiz** ha realizado bajo su tutela académica el Trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título " ESTUDIO MOLECULAR DE GENES IMPLICADOS EN HIPOACUSIA NO SINDRÓMICA AUTOSÓMICA RECESIVA MEDIANTE SECUENCIACIÓN SANGER Y DE NUEVA GENERACIÓN ".

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 30 de octubre de 2015

Fdo.: Begoña Fernández Calvin
Tutora Académica de Tesis

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a mi director de tesis Ignacio del Castillo, supo desde el primer día contagiarme su entusiasmo por la ciencia, y durante los años que ha durado esta tesis me ha sabido guiar a la vez que siempre ha escuchado mis propuestas y opiniones.

A Felipe Moreno, porque gracias a él comencé mi andadura en la investigación cuando todavía era una estudiante de carrera.

A la beca lanzadera CIBERER, a la FIBIO (Fundación para la Investigación Biomédica del hospital Ramón y Cajal) y los fondos del Ministerio de Ciencia e Innovación, por la financiación para el desarrollo de este trabajo.

A Begoña Fernández, mi tutora en la universidad, por haber estado siempre disponible para todo lo que he necesitado y más.

A todos los pacientes y colaboradores, porque sin ellos este estudio no tendría sentido.

A Lolo por sus explicaciones del DHPLC, y el procesado de todas los microsatélites, secuencias, etc. con esta tesis le he dado trabajo...

A Manuela, mi compañera en los inicios, por enseñarme y ayudarme.

A mis chicas del lab12, a las que ya no están pero que siguen estando, Marteta amiga más que compañera, a ver si nos la devuelven pronto los alemanes. A Montse, una gran amiga, con la que aún en la distancia seguimos al día de todo. A Laura por las risas que nos hemos echado con ella. A Elenita, porque siempre ha estado dispuesta a echarme una mano en lo que sea y unas cuantas PCRs de aquí son suyas, y sobre todo por ser una buena amiga. A Tamara, que en poco tiempo supo conquistarnos... siempre voluntariosa y dispuesta, que me ha ayudado en todo lo que ha podido. A Gema, otra buena amiga que me llevo.

A Gloria y Yoli, por hacernos las comidas mucho más amenas. A MJ dj por haber sido nuestra madre en lo bueno y en lo malo durante muchos años.

:(Os voy a echar muchísimo de menos, chicas.

A Elisabete porque me enseñó todo lo que necesitaba saber de los cultivos celulares y transfecciones, sin ella el apartado de los minigenes no hubiera sido posible.

A Francisco por la cesión de controles para el filtrado de exomas y porque siempre me ha ayudado en todo lo que ha podido.

A mis compis del labo, los que están y los que no están, Marta C., Rosa, Matías, Fernando, Ángeles, Lucía, Germán, Alba, Fran, Ana, Nati, José Luis, Milagros, Cristina, Luis, Luciana, Antonio, Concha y Miguel Ángel.

Al Servicio de Genética en general, porque estos 8 años con vosotros me han hecho mejor persona, no sé si volveré a estar en un trabajo tan a gusto como he estado aquí todo este tiempo... ir a trabajar ha sido siempre un placer y no una obligación.

A mi niño, Gabi, porque ya vamos a cumplir 12 años juntos, y han sido los mejores de mi vida. Junto a ti puedo con todo. Me has sabido contagiar tu valentía y has conseguido cosas que parecían imposibles. También gracias por ayudarme con esta tesis en la parte informática, eres un crack.

A mis padres, gracias a ellos estoy donde quiero estar porque siempre me han apoyado en todas las decisiones que he tomado. No podría imaginar unos padres mejores, habéis estado siempre cuando os he necesitado, antes de pedirlo. Y me habéis inculcado los mejores valores.

Gracias a todos, sin vosotros esta tesis no hubiera sido posible.

ÍNDICE

ÍNDICE	7
ABREVIATURAS Y TÉRMINOS TÉCNICOS	8
RESUMEN.....	9
SUMMARY	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Anatomía y fisiología del oído	12
1.2. Trastornos de la audición (hipoacusias)	16
1.3. Genética de las hipoacusias.....	17
1.4. Proteínas codificadas por genes implicados en HNSAR	21
1.5. Genes específicamente investigados en este estudio	25
2. OBJETIVOS.....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. Selección de pacientes	35
3.2. Extracción de ADN.....	35
3.3. Extracción de ARN.....	35
3.4. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	36
3.5. Retrotranscripción	39
3.6. Genotipado con marcadores microsatélites.....	39
3.7. Secuenciación del ADN.....	42
3.8. Análisis de heterodúplex en DHPLC	47
3.9. Predicción in silico de la patogenicidad de las mutaciones encontradas	51
3.10. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).....	52
3.11. Ensayos funcionales con minigenes (gen <i>MYO7A</i>)	53
3.12. Detección de transcritos de los genes implicados en HNSAR en tejidos de fácil muestreo.....	60
3.13. Secuenciación de paneles de genes de hipoacusia.....	62
3.14. Secuenciación de exoma completo Whole Exome Sequencing (WES).....	63
4. RESULTADOS.....	65
4.1. Gen <i>MYO7A</i> (DFNB2).....	66
4.2. Gen <i>PCDH15</i> (DFNB23)	70
4.3. Gen <i>CDH23</i> (DFNB12).....	75
4.4. Gen <i>PJVK</i> (DFNB59)	78
4.5. Investigación de nuevos casos mediante un panel NGS de genes de hipoacusia	83
4.6. Secuenciación de exoma completo (WES).....	87
4.7. Investigación de la expresión de los genes implicados en HNSAR en tejidos de fácil muestreo.....	98
5. DISCUSIÓN	104
5.1. Epidemiología genética de la HNSAR en la población española	105
5.2. Correlaciones genotipo-fenotipo.....	108
5.3. Diagnóstico genético-molecular de HNSAR	115
6. CONCLUSIONES	118
7. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	120
8. BIBLIOGRAFÍA	122

ABREVIATURAS Y TÉRMINOS TÉCNICOS

Aa	Aminoácidos
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> . Albúmina de suero bovino, necesaria funcionando junto a algunas enzimas de restricción, para que éstas no se unan a las superficies plásticas (pipetas o tubos de reacción).
CC	Células Ciliadas
CCE	Células Ciliadas Externas
dB	Decibelios
ddNTPs	Didesoxirribomucleótidos trifosfato
DFNB	Locus de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva
DFNA	Locus de hipoacusia no sindrómica autosómica dominante
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	DiTioTreitol
<i>Frameshift</i>	Mutación tipo delección o inserción de un número de bases no múltiplo de tres que produce cambio de la pauta lectura.
HNSAR	Hipoacusia No Sindrómica Autosómica Recesiva
Ins/del en fase	Mutación tipo inserción o delección de un número de bases múltiplo de tres lo cual no altera la pauta de lectura pero produce inserción o delección de uno o más aminoácidos.
Loci	Plural de locus
Locus	Lugar físico donde se localiza un gen
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i> (Frecuencia media del alelo minoritario)
NGS	Next Generation Sequencing (Secuenciación de nueva generación)
<i>Missense</i>	Mutación tipo sustitución de una base por otra que produce cambio de aminoácido.
<i>Nonsense</i>	Mutación de sustitución de una base por otra que produce cambio a codón de parada.
Pb	Pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
Rpm	Revoluciones por minuto
U	Unidad de enzima. Una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir 1µg de ADN λ en una hora a la temperatura óptima de la enzima en un volumen de 50 µL.
USH1	Locus de síndrome de Usher tipo 1
USH2	Locus de síndrome de Usher tipo 2

RESUMEN

La hipoacusia es el trastorno neurosensorial más frecuente en humanos. Presenta una gran heterogeneidad genética, con 133 loci cartografiados y 90 genes identificados hasta la fecha, sólo para las formas no sindrómicas. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los genes *MYO7A*, *PCDH15*, *CDH23* y *PJVK* en una cohorte de pacientes con Hipoacusia No Sindrómica de herencia Autosómica Recesiva (HNSAR) en los que se habían excluido mutaciones en el locus DFNB1 (genes *GJB2* y *GJB6*). Se utilizó el análisis de haplotipos para marcadores microsatélites, el análisis de heterodúplex de ADN en DHPLC y la secuenciación Sanger. De este modo, descubrimos las mutaciones responsables de la hipoacusia en el gen *MYO7A* (2 familias), en *PCDH15* (3 familias), en *CDH23* (2 familias) y en *PJVK* (3 familias). Este trabajo, unido a resultados previos de nuestro laboratorio nos ha permitido completar el primer estudio global de la epidemiología genética de la HNSAR en la población española (52 genes investigados en 140 familias).

Por otra parte, hemos utilizado un panel de secuenciación masiva de genes de hipoacusia para investigar un grupo de 13 familias con HNSAR en las que se habían excluido mutaciones en el locus DFNB1. Encontramos las mutaciones causantes de la hipoacusia en 6 de las 13 familias. Con el fin de identificar nuevos genes implicados en HNSAR realizamos secuenciación de exoma completo de las 7 familias restantes y de 6 familias no elucidadas procedentes de nuestro estudio epidemiológico. En tres familias encontramos mutaciones en genes no incluidos en el panel y en otras dos familias hallamos mutaciones en dos genes implicados en hipoacusias sindrómicas. En total, en el curso de este trabajo hemos identificado 28 mutaciones patogénicas, 18 de ellas no descritas previamente.

Por último, dado que no se puede acceder a los ARNm de oído interno en pacientes vivos, hemos estudiado la expresión de los genes implicados en HNSAR en tejidos de fácil muestreo (sangre, saliva y orina). Se investigaron cinco controles normoyentes (2 varones y 3 mujeres) para hacer RT-PCR, dos de los cuales (un varón y una mujer) se estudiaron además por secuenciación masiva del ARN (*RNAseq*). Los resultados obtenidos indican que casi la totalidad de los genes implicados en HNSAR se expresan en al menos uno de estos tejidos, mayoritariamente la sangre.

SUMMARY

Hearing impairment is the most common sensorineural disorder in humans. It shows a huge genetic heterogeneity, so that 133 loci have been mapped and 90 genes have been identified to date, only for non-syndromic forms. We have focused this study on the *MYO7A*, *PCDH15*, *CDH23* and *PJVK* genes in a cohort of patients with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI), in whom mutations in the DFNB1 locus (genes *GJB2* and *GJB6*) had been excluded. We used haplotype analysis for microsatellite markers, analysis of DNA heteroduplexes in DHPLC, and Sanger sequencing. In this way, we found the mutations responsible for the hearing impairment in the *MYO7A* gene (2 families) in *PCDH15* (3 families), in *CDH23* (2 families) and in *PJVK* (3 families). This work, together with previous results of our laboratory has allowed us to complete the first global study on the genetic epidemiology of ARNSHI in the Spanish population (52 genes were screened in 140 families).

In addition, we used a next-generation sequencing (NGS) panel for genes involved in ARNSHI to investigate a group of 13 families in which we had excluded mutations in the DFNB1 locus. We found the deafness-causing mutations in 6 out of those 13 families. In order to identify novel genes involved in ARNSHI, we performed whole-exome sequencing in the remaining 7 families and in 6 non-elucidated families from our epidemiological study. In three families we found mutations in known ARNSHI genes that were not included in the NGS panel, and in two other families we found mutations in two genes involved in syndromic hearing impairment. Globally, in this work we have identified 28 pathogenic mutations, 18 of which have not been described previously.

Finally, given that mRNAs from the inner ear can not be obtained from live patients, we have studied the expression of the genes involved in ARNSHI in tissues that can be sampled easily (blood, urine, saliva). We investigated five control subjects with normal hearing (2 males and 3 females) by means of RT-PCR, two of which were also studied through massively-parallel RNA sequencing (RNA-seq). Our results indicate that almost every gene involved in ARNSHI is expressed in at least one of those tissues, blood being the tissue with more expressed genes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anatomía y fisiología del oído

El oído humano es un órgano extraordinariamente complejo que se compone de tres partes: oído externo, oído medio y oído interno (Figura 1).

- El **oído externo** lo forman el pabellón auricular y el conducto auditivo externo, y es la parte encargada de la recepción y canalización del sonido.
- El tímpano y la cadena de huesecillos (martillo, yunque y estribo) componen el **oído medio**, que se encarga de la transmisión del sonido.
- El **oído interno** lo forman la cóclea, que se encarga de la transformación de la señal mecánica del sonido en impulso nervioso que pueda interpretarse en el cerebro, y el vestíbulo y los canales semicirculares, que son responsables del sentido del equilibrio.

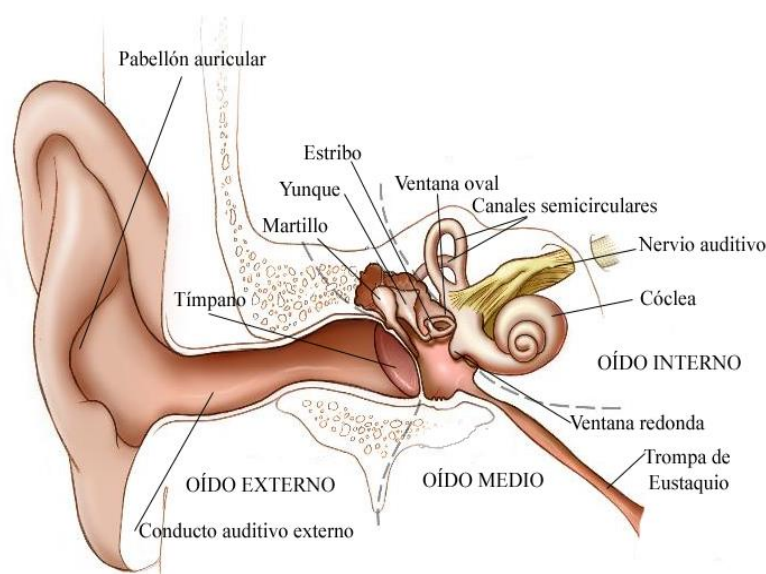


Figura 1. Anatomía del oído humano. [Esquema modificado de: [http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Sensory - Hearing and Balance Development](http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Sensory%20-%20Hearing%20and%20Balance%20Development)].

La cóclea es una estructura helicoidal y en su interior hay tres cavidades, la rama vestibular, la rama media y la rama timpánica. La membrana de Reissner separa la rama vestibular y la rama media, y la membrana basilar la rama media y la rama timpánica. Las rampas vestibular y timpánica están rellenas de perilinfa, líquido con alta concentración de Na^+ y baja de K^+ . La rama media está rellena de un líquido especial, la endolinfa, secretada por la estría vascular, que se caracteriza por la alta concentración de iones K^+ y baja de iones Na^+ . Sobre la membrana basilar, proyectándose hacia la rama media, se localiza el órgano de Corti (Figura 2). El órgano de Corti está constituido por las células de soporte, las células ciliadas y una estructura rígida y acelular denominada membrana tectoria (Figura 3).

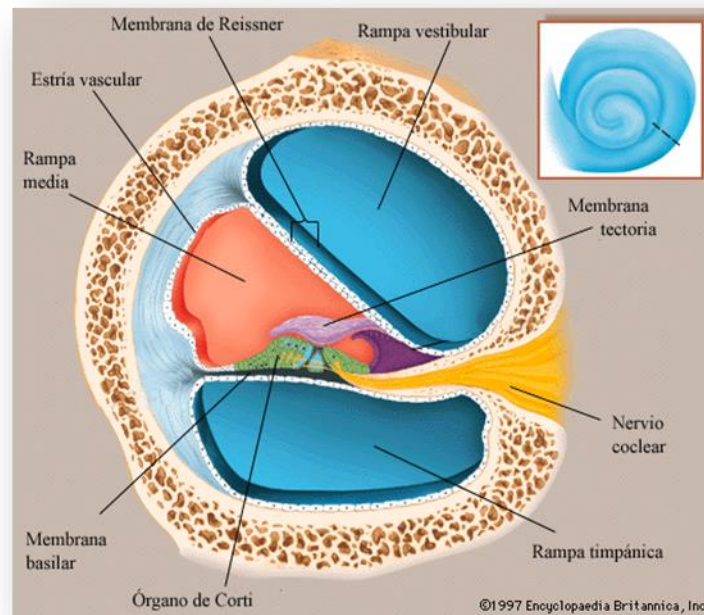


Figura 2. Corte transversal de la cóclea. [Esquema modificado de *Encyclopaedia Britannica*, 1997].

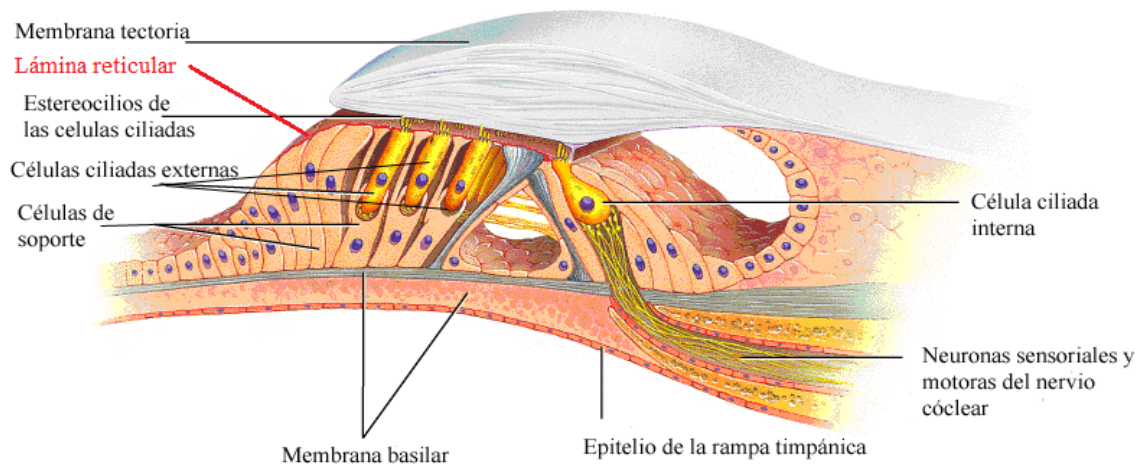


Figura 3. Estructura del órgano de Corti. [Esquema modificado de Fleming, 2014 <http://slideplayer.com/slide/4301328/>, John Wiley & Sons. Inc].

El órgano de Corti contiene unas 16.000 células ciliadas. Las células ciliadas son células sensoriales especializadas. Hay dos tipos de células ciliadas (CC): internas (CCI), que se disponen en una única fila, y externas (CCE), que se disponen en tres hileras. Las CC, en su parte apical, tienen microvellosidades especializadas denominadas estereocilios, que se encuentran en contacto con la membrana tectoria (Figura 4). Las CCE se encargan de amplificar la señal sonora, y las CCI, de traducir la onda de sonido en un impulso nervioso.

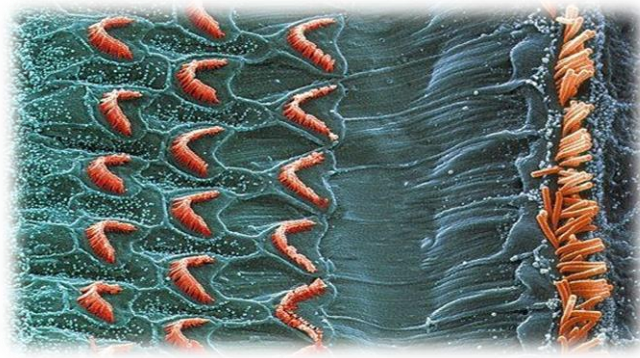


Figura 4. Fotografía de microscopía de barrido que muestra la superficie apical del órgano de Corti. Se ven coloreados los estereocilios de las células ciliadas. Las tres hileras de la izquierda corresponden a las células ciliadas externas y la hilera derecha, a las células ciliadas internas [www.visualphotos.com].

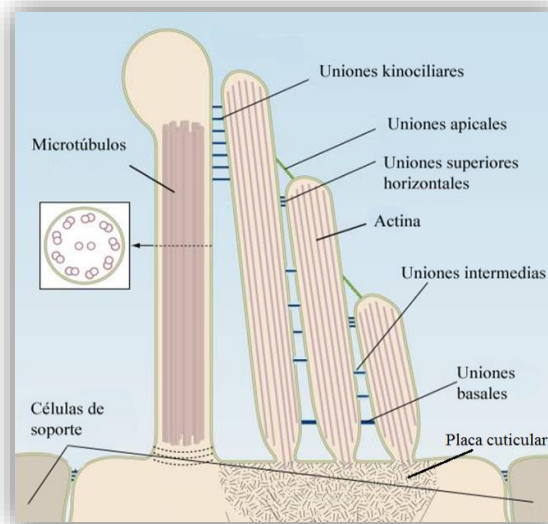


Figura 5. Esquema de las uniones entre los estereocilios y de éstos con el kinocilio. El kinocilio es una estructura rígida que desaparece tras la maduración de las células ciliadas. Está formado por microtúbulos, a diferencia de los estereocilios formados por filamentos de actina. [Esquema modificado de Schwander et al., 2010].

El interior de los estereocilios está constituido por filamentos de actina. Los estereocilios se disponen en varias filas escalonadas. Los de la misma célula se encuentran ligados entre sí mediante diferentes uniones: uniones apicales (*tip links*), uniones superiores horizontales (*horizontal top connectors*), uniones intermedias (*shaft connectors*), uniones basales (*ankle links*) y uniones kinociliares (con el kinocilio). El kinocilio es un cilio especializado, así que está formado por microtúbulos (en lugar de filamentos de actina) y es una estructura efímera que sirve como guía para la correcta disposición de los estereocilios durante la maduración de la célula ciliada (Figura 5) [Schwander et al., 2010]. Las únicas uniones que se mantienen en las células ciliadas maduras son las uniones apicales (*tip links*) y las uniones superiores horizontales (*horizontal top connectors*).

La cóclea presenta una organización tonotópica, de forma que las células ciliadas reciben diferentes frecuencias de sonido, según su posición a lo largo del ducto coclear, en un gradiente que va desde la base de la cóclea (altas frecuencias) hasta el ápice (bajas frecuencias).

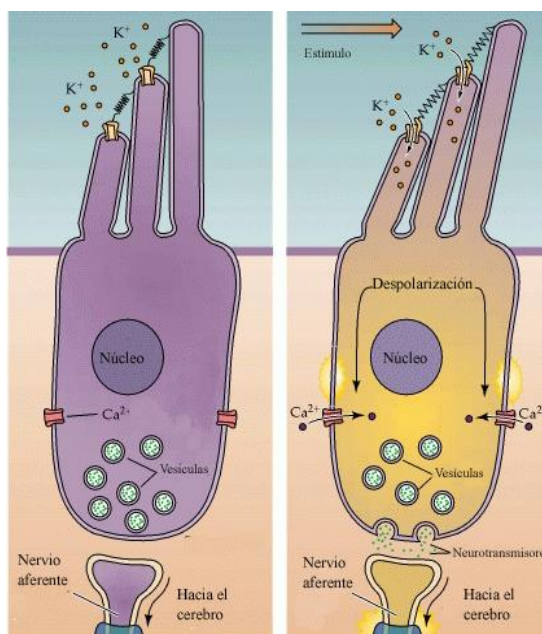


Figura 6. Mecanotransducción en las CCI. Tras un estímulo mecánico, los estereocilios se desplazan. Por la tensión generada en las uniones apicales, se produce la apertura de canales de K^+ , lo que provoca la despolarización de la célula y la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y en consecuencia la liberación de neurotransmisores en la parte basal de la célula. [Esquema modificado de Purves et al., 2001].

En el proceso de la audición, las ondas sonoras llegan por el pabellón auricular, atraviesan el conducto auditivo externo y hacen vibrar al tímpano, que transmite ese movimiento a la cadena de huesecillos (Figura 1). El estribo lo transmite a su vez a la ventana oval, lo que hace que el sonido se convierta en ondas de fluido en la perilinfa a lo largo de la rampa vestibular (Figura 2). El movimiento de la perilinfa se transmite a través de la membrana de Reissner a la endolinfa de la rampa media. Se produce el movimiento sinusoidal de la membrana basilar, sobre la que se sitúa el órgano de Corti; este movimiento hace que se desplacen los estereocilios de las células ciliadas del órgano de Corti y este desplazamiento provoca la apertura de canales para la entrada de potasio, lo que despolariza a la célula ciliada y produce la entrada de iones de calcio y la liberación de neurotransmisores en su parte basal (Figura 6). De esta forma, las células ciliadas transforman la señal mecánica en impulsos nerviosos (mecanotransducción), que se dirigen a través del nervio coclear hasta el sistema nervioso central.

Las células ciliadas realizan la mecanotransducción en menos de 10 microsegundos, velocidad necesaria para interpretar correctamente señales de altas frecuencias y para

asegurar la localización espacial de un sonido. Además las células ciliadas pueden adaptarse de forma rápida a estímulos constantes, permitiendo que seamos capaces de extraer señales en un ambiente ruidoso [Purves et al., 2001].

1.2. Trastornos de la audición (hipoacusias)

La hipoacusia es el trastorno neurosensorial más frecuente en los países desarrollados. Aproximadamente 1 de cada 1.000 nacidos vivos viene al mundo con un problema de sordera congénita. El impacto de la hipoacusia en la vida de las personas depende de su gravedad y de la edad a la que se manifiesta. Cuando la hipoacusia es grave y se manifiesta en la primera infancia suele conllevar retraso en la adquisición del habla y en el desarrollo cognitivo y psicosocial del individuo. La aparición de la hipoacusia en etapas más tardías compromete la calidad de vida y puede producir aislamiento social [Kalatzis and Petit, 1998]. Las hipoacusias se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios.

Según la edad de manifestación, se diferencian dos tipos de hipoacusias:

- **Prelocutivas:** cuando la hipoacusia se manifiesta antes de la adquisición del lenguaje.
- **Postlocutivas:** si la hipoacusia aparece después de la adquisición del lenguaje.

Según la localización de la lesión, se diferencian dos tipos de hipoacusia:

- **Conductiva:** cuando la lesión se encuentra en el oído externo o medio.
- **Neurosensorial:** es la producida por un defecto en la transmisión de la señal desde el oído interno a los centros corticales auditivos del cerebro (la mayoría debidas a lesiones cocleares) [Kalatzis and Petit, 1998].

Las de tipo mixto son una combinación de ambas [Smith RJ et al., 2005].

De acuerdo con la gravedad de la pérdida auditiva, hay cuatro tipos de hipoacusia:

- **Leve** (pérdidas entre 20 y 40 dB)
- **Moderada** (entre 41 y 70 dB)
- **Severa** (entre 71 y 95 dB)
- **Profunda** (mayores de 95 dB) [Mazzoli et al., 2003]

Las hipoacusias a su vez se pueden clasificar según su progresión en el tiempo en:

- **Estables:** cuando la hipoacusia se mantiene sin variación.
- **Progresivas:** cuando a lo largo del tiempo la hipoacusia se va agravando.

De acuerdo con la clínica de los pacientes, las hipoacusias se pueden clasificar en dos grupos:

- **Sindrómicas:** cuando junto a la hipoacusia aparecen otros signos clínicos asociados, como pueden ser retinosis pigmentaria (síndrome de Usher), problemas renales

(síndrome de Alport, síndrome branquiotorenal,...), cardíacos (síndrome de Jervell-Lange-Nielsen), etc.

- **No sindrómicas:** cuando la hipoacusia es el único signo que presentan los pacientes.

Según la causa, se distinguen dos tipos de hipoacusias:

- **Genéticas** o hereditarias. Las hipoacusias genéticas se producen por mutación en uno o varios genes y pueden clasificarse a su vez según el tipo de herencia: autosómica dominante (10-20% de los casos), autosómica recesiva (~70% de los casos), ligada al sexo (del 1 al 2% de los casos) y de herencia materno-mitocondrial (hasta el 15% según la población) [del Castillo, 2007].
- **Ambientales.** Las hipoacusias ambientales se pueden producir por diferentes causas: infecciones prenatales (ej. citomegalovirus, herpesvirus, rubeola y toxoplasma), infecciones postnatales (meningitis bacterianas), sufrimiento fetal, hiperbilirrubinemia, ototoxicidad de fármacos y exposición a ruido excesivo y/o continuado [Kochhar et al., 2007].

También se producen hipoacusias por combinación de causas ambientales y genéticas. La presbiacusia (sordera asociada al envejecimiento) se considera multifactorial [Schrijver, 2004]. Además la susceptibilidad a los factores ambientales tiene una predisposición con base genética.

En países desarrollados, las causas genéticas dan cuenta de más del 60% de los casos de hipoacusia.

1.3. Genética de las hipoacusias

Las hipoacusias no sindrómicas presentan una gran heterogeneidad genética. Esta elevada heterogeneidad es debida a la enorme complejidad del oído, que conlleva la implicación de numerosas especies de proteínas diferentes. Hasta la fecha hay cartografiados 133 *loci* relacionados con hipoacusia no sindrómica. Los *loci* de estas hipoacusias se nombran, según el modo de herencia, como DFNA (dominantes), DFNB (recesivos), DFNX (ligados al cromosoma X) y DFNY (ligados al cromosoma Y). A estas siglas se les añade un número, que indica el orden cronológico en el que fueron identificados. Por extensión, el nombre del *locus* suele utilizarse también para nombrar la hipoacusia causada por mutaciones en el mismo. En relación con estos *loci* se han identificado hasta la fecha 90 genes, de los cuales 61 se asocian con Hipoacusia No Sindrómica Autosómica Recesiva (HNSAR). En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de genes relacionados con este subgrupo de hipoacusias (Tabla 1).

Tabla 1. Genes conocidos hasta la fecha implicados en HNSAR.

Gen	Proteína	Función en el oído	Tipos de hipoacusia
<i>ADCY1</i>	Adenilato ciclasa 1	Producción de cAMP necesario para la mecanotransducción	DFNB44
<i>BSND</i>	Barttina	Subunidad β de canales de cloruro, formación de la endolinfa	DFNB73 Síndr. de Bartter tipo 4A
<i>CABP2</i>	CaBP2	Unión a calcio, regulación de canales de calcio $Ca_v1.3$	DFNB93
<i>CDH23</i>	Cadherina-23	Uniones entre estereocilios	DFNB12 Síndr. de Usher tipo 1D
<i>CIB2</i>	CIB2	Unión a calcio e integrinas, estereocilios	DFNB48 Síndr. de Usher tipo 1J
<i>CLDN14</i>	Claudina-14	Uniones intercelulares estrechas	DFNB29
<i>CLIC5</i>	CLIC5	Canal de cloruro intracelular	DFNB103
<i>COL11A2</i>	Colágeno XI, $\alpha 2$	Membrana tectoria	DFNA13, DFNB53 Síndr. de Stickler, OSMED
<i>DCDC2</i>	DCDC2	Citoesqueleto de los kinocilios	DFNB66
<i>DFNB59</i>	Pejvakina	Función desconocida	DFNB59
<i>ELMOD3</i>	ELMOD3	Activador de la GTPasa Arl2	DFNB88
<i>EPS8</i>	EPS8	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB102
<i>EPS8L2</i>	EPS8L2	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB (sin número aún)
<i>ESPN</i>	Espina	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB36
<i>ESRRB</i>	Receptor β relacionado con estrógenos	Desconocida	DFNB35
<i>FAM65B</i>	FAM65B	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB104
<i>GIPC3</i>	GIPC3	¿Tráfico vesicular?	DFNB15/B72/B95
<i>GJB2</i>	Conexina-26	Uniones intercelulares comunicantes	DFNA3A, DFNB1
<i>GJB6</i>	Conexina-30	Uniones intercelulares comunicantes	DFNA3B, DFNB1
<i>GPSM2</i>	GPSM2	Mantenimiento de polaridad celular	DFNB82
<i>GRXCR1</i>	GRXCR1	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB25
<i>GRXCR2</i>	GRXCR2	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB101
<i>HGF</i>	Factor de crecimiento de hepatocitos	Desconocida	DFNB39
<i>ILDR1</i>	ILDR1	Uniones intercelulares estrechas	DFNB42
<i>KARS</i>	Lisil-tRNA sintetasa	Aminoacilación de tRNAs en citoplasma y en mitocondria	DFNB89
<i>LOXHD1</i>	LOXHD1	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB77
<i>LRTOMT</i>	LRTOMT1 y LRTOMT2	Catecol-O-metiltransferasa	DFNB63
<i>MARVELD2</i>	Tricelulina	Uniones intercelulares estrechas	DFNB49
<i>MET</i>	Met	Tirosina quinasa	DFNB97
<i>MSRB3</i>	Met-sulfóxido reductasa	Protección frente a daño oxidativo	DFNB74
<i>MYO15A</i>	Miosina XVa	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB3
<i>MYO3A</i>	Miosina IIIa	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB30
<i>MYO6</i>	Miosina VI	Citoesqueleto de los estereocilios Sinapsis auditiva en cinta	DFNA22, DFNB37 Miocardiopatía hipertrófica

(Continúa en la página siguiente)

Gen	Proteína	Función en el oído	Tipos de hipoacusia
<i>MYO7A</i>	Miosina VIIa	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNA11, DFNB2 Síndr. de Usher tipo 1B
<i>NARS2</i>	Asparaginil-tRNA sintetasa	Aminoacilación de tRNAs en la mitocondria	DFNB94, Síndr. de Leigh
<i>OTOA</i>	Otoancorina	Matriz extracelular	DFNB22
<i>OTOF</i>	Otoferlina	Tráfico vesicular sináptico	DFNB9
<i>OTOG</i>	Otogelina	Membrana tectoria	DFNB18
<i>OTOGL</i>	Prot. similar a otogelina	Membrana tectoria	DFNB84
<i>PCDH15</i>	Protocadherina-15	Adhesión celular	DFNB23/USH1F
<i>PDZD7</i>	Proteína 7 con dominio PDZ	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB57 y Síndr. de Usher tipo 2
<i>PNPT1</i>	Polinucleótido fosforilasa	Importación mitocondrial de RNAs pequeños	DFNB70, Trastorno de la cadena respiratoria
<i>PTPRQ</i>	PTPRQ	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB84
<i>RDX</i>	Radixina	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB24
<i>SERPINB6</i>	Serpina B6, inhibidor de proteasas	¿Protección frente a fugas de contenido lisosomal?	DFNB91
<i>SLC26A4</i>	Pendrina	Transportador de aniones	DFNB4 y Síndr. de Pendred
<i>SLC26A5</i>	Prestina	Motilidad de células ciliadas externas	DFNB61
<i>STRC</i>	Estereocilina	Conexión de estereocilios a la membrana tectoria	DFNB16
<i>SYNE4</i>	Nesprina-4	Posicionamiento del núcleo en células ciliadas externas	DFNB76
<i>TBC1D24</i>	TBC1D24	Señalización celular	DFNA65, DFNB86 Síndr. DOORS
<i>TECTA</i>	α -tectorina	Membrana tectoria	DFNA8/A12, DFNB21
<i>TMC1</i>	TMC1	Componente del canal de mecanotransducción	DFNA36, DFNB7/B11
<i>TMEM132E</i>	Proteína transmembrana 132E	Desconocida	DFNB99
<i>TMHS</i>	TMHS	Componente del canal de mecanotransducción	DFNB67
<i>TMIE</i>	TMIE	Componente del canal de mecanotransducción	DFNB6
<i>TMPRSS3</i>	TMPRSS3	Enzima proteolítica	DFNB8/B10
<i>TPRN</i>	Taperina	¿Citoesqueleto de los estereocilios?	DFNB79
<i>TRIOBP</i>	TRIOBP	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB28
<i>TSPEAR</i>	TSPEAR	Matriz extracelular	DFNB98
<i>USH1C</i>	Harmonina	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB18 Síndr. de Usher tipo 1C
<i>WHRN</i>	Whirlina	Citoesqueleto de los estereocilios	DFNB31 Síndr. De Usher tipo 2D

Existe poca información sobre la epidemiología de la HNSAR en la mayoría de las poblaciones. En general se estima que las mutaciones en el *locus* DFNB1 (que incluye los

genes *GJB2* y *GJB6*) son la causa de aproximadamente el 50% de los casos [Dylan et al., 2013]. En la población española tiene también una contribución relevante el gen *OTOF* (DFNB9), cuyas mutaciones estarían presentes en al menos el 3% de los pacientes con HNSAR [Migliosi et al., 2002; Rodríguez-Ballesteros et al., 2008]. La contribución del gen *SLC26A4* (DFNB4) sería también cercana al 3% [Pera et al., 2008].

Hay que resaltar que mutaciones en los genes implicados en HNSAR pueden producir también hipoacusias sindrómicas (Tabla 1). El caso más notorio es el del síndrome de Usher, de herencia autosómica recesiva y que comparte seis genes con la HNSAR. El síndrome de Usher es la causa más frecuente de sordoceguera en el mundo, con una incidencia de 1 cada 20.000 nacimientos. Se caracteriza por la asociación de hipoacusia con retinosis pigmentaria [Petit et al., 2001]. Ésta es una degeneración progresiva de las células de la retina que conlleva la pérdida de visión periférica, de forma que estos pacientes tienen lo que se denomina “visión en túnel”. Se diferencian tres tipos de síndrome de Usher atendiendo a la edad de inicio, gravedad y progresión de los signos clínicos. El síndrome de Usher de tipo 1 es el más grave, puesto que la hipoacusia es congénita y va de severa a profunda, la retinosis pigmentaria se manifiesta en la infancia y además va acompañado de disfunción vestibular. En el síndrome de Usher de tipo 2 la hipoacusia es también congénita y va de moderada a severa, pero la retinosis pigmentaria es peri-postpuberal. En el síndrome de Usher de tipo 3 la hipoacusia es postlocutiva, progresiva y de gravedad variable, y el momento de aparición de la retinosis pigmentaria es también variable [Davenport et al., 1977]. Algunos casos no son fácilmente clasificables dentro de las categorías mencionadas y suelen denominarse síndromes de Usher atípicos [Millán et al., 2011].

En general, la frontera entre las hipoacusias sindrómicas y no sindrómicas es muy difusa. Téngase en cuenta que en algunos síndromes el primer signo clínico que se manifiesta es la hipoacusia (el propio síndrome de Usher por ejemplo), lo que lleva a un diagnóstico inicial de hipoacusia no sindrómica, que debe ser corregido cuando posteriormente aparecen signos clínicos en otros órganos. Por otra parte, se han descrito también casos de variabilidad fenotípica intrafamiliar, es decir, familias en las que coexisten individuos con hipoacusia sindrómica e individuos con hipoacusia no sindrómica, atribuibles a las mismas mutaciones en un mismo gen.

El fenotipo de los pacientes con HNSAR en pocos casos ayuda a dirigir la investigación a un gen concreto, ya que en general los rasgos fenotípicos son bastante homogéneos entre los pacientes con mutaciones en diferentes genes. Por ejemplo un 40% de los pacientes en nuestro laboratorio tienen hipoacusia profunda, y ésta puede ser causada por mutaciones en una numerosa batería de genes. Sin embargo, existen casos concretos en los que el fenotipo

es muy informativo. Por ejemplo, los pacientes con mutaciones en el gen *SLC26A4* (DFNB4) se caracterizan por tener el acueducto vestibular dilatado (EVA, Enlarged Vestibular Aqueduct). La neuropatía auditiva es otro rasgo fenotípico característico de algunos pacientes. Se caracteriza por la ausencia o grave alteración de las respuestas en los Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral (PEATC), en presencia de OtoEmissiones Acústicas normales (OEA), lo que indica que las CCE mantienen su electromotilidad, pero que la lesión se localiza en las CCI o el nervio auditivo. Se ha descrito neuropatía auditiva en pacientes con mutaciones en *OTOF* (DFNB9) y *PJVK* (DFNB59).

1.4. Proteínas codificadas por genes implicados en HNSAR

La identificación de los genes implicados en las hipoacusias ha producido importantes contribuciones al conocimiento de la fisiología del oído interno, al revelar numerosas piezas de la maquinaria molecular responsable de la audición.

Las proteínas codificadas por genes implicados en HNSAR se pueden clasificar en diversos grupos según la función que realizan. A continuación se indican las principales clases funcionales ilustradas con los ejemplos más significativos. Además, debe tenerse en consideración que queda por clarificar la función de cierto número de las proteínas identificadas (Tabla 1).

1.4.1. Proteínas implicadas en homeostasis iónica coclear

1.4.1.1. Uniones intercelulares

- **Uniones comunicantes (*gap junctions*)**

Las proteínas de la familia de las conexinas forman uniones comunicantes que conectan las membranas plasmáticas de dos células adyacentes, a través de las cuales se establece el flujo de iones, segundos mensajeros y pequeños metabolitos.

En el oído interno la **conexina 26** (codificada por el gen *GJB2*) y la **conexina 30** (*GJB6*) forman redes de uniones comunicantes que conectan las células de soporte del órgano de Corti y diversos tipos celulares del limbo espiral, del ligamento espiral y de la estría vascular. A través de estas uniones comunicantes se produce la recirculación del potasio desde las CC hasta las células marginales de la estría vascular [Kikuchi et al., 2000].

- **Uniones estrechas**

Este tipo de uniones son muy importantes para compartimentar el órgano de Corti. La parte apical de las membranas de las células ciliadas y las células de soporte están interconectadas por complejas uniones celulares estrechas que permiten mantener la distinta composición iónica de cada compartimento.

La **claudina-14** (*CLDN14*) forma uniones estrechas bicelulares, mientras que la **tricelulina** (*MARVELD2*) y la proteína **ILDR1** (*ILDR1*) forman uniones estrechas tricelulares, que en el órgano de Corti se localizan en la lámina reticular (Figura 3) [Duman and Tekin, 2013] [Borck et al., 2011] [Higashi et al., 2015].

1.4.1.2. Transportadores de membrana

- **Canales iónicos**

Canal de mecanotransducción (MET). La estructura completa del canal MET aún no se conoce, pero sí se han identificado algunas subunidades que lo forman (Figura 7): las proteínas **TMIE**, **TMHS**, y **TMC1** (codificadas por los genes homónimos), que son proteínas transmembranales de los estereocilios de las CC. Estas tres proteínas se unen al dominio carboxilo terminal intracelular de la protocadherina-15 [Zhao et al., 2014] [Beurg et al., 2015], componente de los *tip links*. En particular, TMHS regula el ensamblaje del *tip link* y la conductancia del canal de mecanotransducción [Xiong et al., 2012].

La **barttina** (*BSND*) es una subunidad accesoria de los canales de cloro del oído interno. La secreción de endolinfa que realiza la estría vascular requiere, entre otras especies moleculares, un cotransportador de sodio, potasio y cloro ($K^+/Na^+/2Cl$) presente en la membrana de las células marginales de la estría. El cloro que introduce este transportador sale de dichas células por los canales de los que forma parte la barttina [Rickheit et al., 2008].

- **Transportadores de soluto**

La **pendrina** (*SLC26A4*) es un transportador de cloro y bicarbonato. En la cóclea, se ocupa de secretar bicarbonato a la endolinfa, impidiendo la acidificación de ésta, y así contribuye a la homeostasis iónica de los fluidos cocleares [Wangemann et al., 2007].

La **prestina** (*SLC25A5*) pertenece a la misma familia de transportadores iónicos que la **pendrina**. Sin embargo, no funciona como un verdadero transportador y su papel en la cóclea está relacionado con los cambios conformacionales que se producen en esta proteína en respuesta al voltaje. De esta forma, la **prestina** actúa como un motor molecular que confiere electromotilidad a las CCE, propiedad mediante la que amplifican la señal sonora [Pickles, 2012].

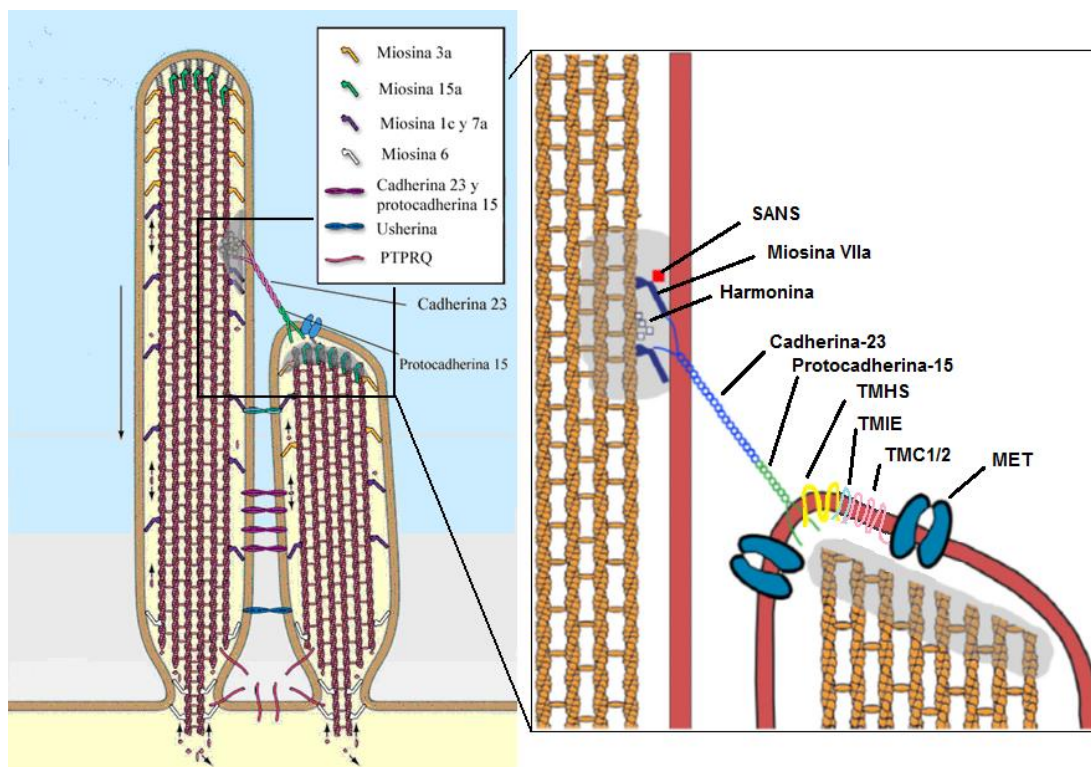


Figura 7. Representación de dos estereocilios indicando la localización de varias de las proteínas estudiadas. [Modificada de Schwander et al., 2010]. En el recuadro ampliado se muestran las proteínas que intervienen en la formación y mantenimiento de los *tip links* y en el canal de mecanotransducción [Esquema modificado de Cosgrove y Zallochi, 2014].

1.4.2. Proteínas del paquete de estereocilios

Las numerosas especies moleculares que forman parte del paquete de estereocilios constituyen un interactoma que incluye proteínas de adhesión celular, proteínas del andamiaje submembranar y proteínas del citoesqueleto [Richardson et al., 2011].

La **cadherina-23** (gen *CDH23*) y la **protocadherina-15** (*PCDH15*) son proteínas de membrana que proyectan gran parte de su estructura hacia el exterior de la célula, y pequeños dominios C-terminales hacia el citosol. El *tip link* está constituido por un

homodímero de cadherina-23 anclado a la membrana del estereocilio superior, que se une a un homodímero de cadherina-23 anclado al estereocilio inferior. La interacción se produce entre los extremos N-terminales de ambas proteínas. Mediante sus dominios C-terminales interaccionan a su vez con otras proteínas del citoesqueleto. Además, el dominio C-terminal de la protocadherina-15 interactúa con el canal de mecanotransducción [Reiners et al., 2006] (Figura 7).

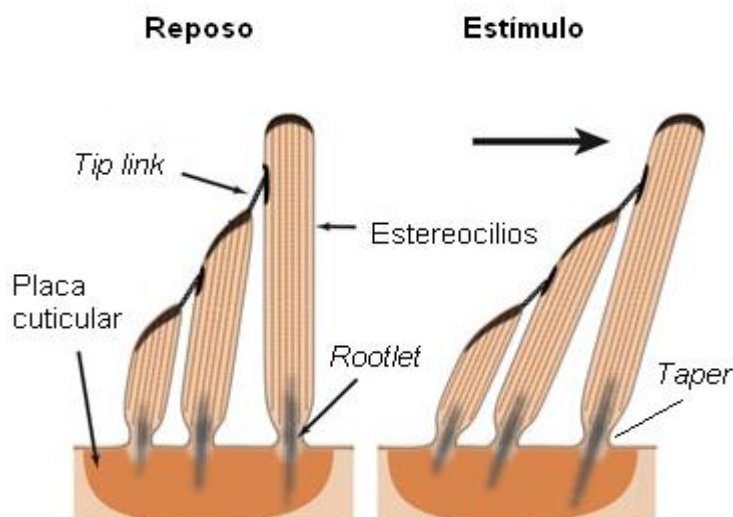


Figura 8. Estructura de los estereocilios en las CC maduras. [Esquema modificado de Peng et al., 2011].

Los estereocilios están rellenos de filamentos de actina que interactúan con un grupo numeroso de proteínas que incluye miosinas no convencionales y otros componentes del citoesqueleto, que se encargan de regular el crecimiento de los estereocilios y de mantener su estructura. La **harmonina** (*USH1C*) une los dominios C-terminales de cadherina-23 y protocadherina-15 a los filamentos de actina (Figura 7). Así mismo, se piensa que la **radixina** (*RDX*) y, posiblemente, la proteína **LOXHD1** [Grillet et al., 2009], unen los filamentos de actina a la membrana plasmática [Duman and Tekin, 2013]. En estos entramados moleculares que mantienen la estructura de los estereocilios participan también la **whirlina** (*WHRN*) y la **miosina VIIa** (*MYO7A*) [Schwander et al., 2010]. Por su parte, la **miosina IIIa** (*MYO3A*) y su ligando, la **espina** (*ESPN*) [Salles et al., 2009], así como la **miosina XVa** (*MYO15A*) y su ligando, la **whirlina**, se localizan en los extremos apicales de los estereocilios, donde se produce la polimerización de los filamentos de actina, y regulan la longitud de los mismos. Otro grupo de proteínas se localizan en la parte basal de los estereocilios y desempeñan funciones estructurales o de mantenimiento: la **taperina** (*TPRN*), en la región donde los estereocilios se estrechan (en inglés, *taper*) [Rehman et al., 2010]; la proteína de unión a actina llamada **TRIOBP** en las raicillas (*rootlets*) de los estereocilios; la **miosina VI**

(*MYO6*) [Hasson et al. 1997, Self et al. 1999 y Seiler et al. 2004] y la proteína **PTPRQ** [Oganesian et al., 2003], en la placa cuticular (Figura 8).

1.4.3. Proteínas de la membrana tectoria

La **α -tectorina** (*TECTA*) y la cadena α -2 del **colágeno XI** (*COL11A2*) forman parte de los componentes estructurales mayoritarios de la membrana tectoria. Entre los componentes minoritarios se encuentran las otogelinas (*OTOG* y *OTOGL*).

La **estereocilina** (*STRC*) [Verpy et al., 2011] y la **otoancorina** (*OTOA*), se encargan de anclar la membrana tectoria a las células del órgano de Corti [Zwaenepoel et al., 2002].

1.4.4. Proteínas relacionadas con la neurotransmisión

La **otoferlina** (*OTOF*) pertenece a la familia de las ferlinas, que están implicadas en procesos de fusión de membranas. En el oído interno, la otoferlina es imprescindible para la liberación de neurotransmisores por la parte basal de las CC, actuando aparentemente como un sensor de calcio que regula la exocitosis de las vesículas sinápticas. Por su parte, la **pejvakina** (*PJVK*) se localiza en las neuronas del ganglio espiral y en varios núcleos de la vía auditiva aferente [Delmaghani et al., 2006], mientras que la proteína **TBC1D24** se localiza fundamentalmente en las neuronas del ganglio espiral [Rehman et al., 2014]. Las funciones concretas de estas proteínas aún no han sido clarificadas.

1.5. Genes específicamente investigados en este estudio

1.5.1. *MYO7A* (DFNB2)

El gen *MYO7A* se localiza en 11q13.5, abarca un total de 87 Kb de ADN y está formado por 49 exones (48 codificantes). Codifica 3 isoformas distintas de la proteína miosina VIIa. La más larga está codificada por los 48 exones y consta de 2215 aa. La segunda isoforma cuenta con 2175 aa, es más pequeña que la isoforma principal porque está codificada por un ARNm que pierde por *splicing* alternativo un fragmento en fase (108 nucleótidos) del exón 35. La tercera isoforma, de 1178 aa, está codificada por un ARNm que carece de los últimos 22 exones del gen (Figura 9). El gen *MYO7A* se expresa en cóclea, retina, en testículo, pulmón y riñón [Hasson et al., 1995].

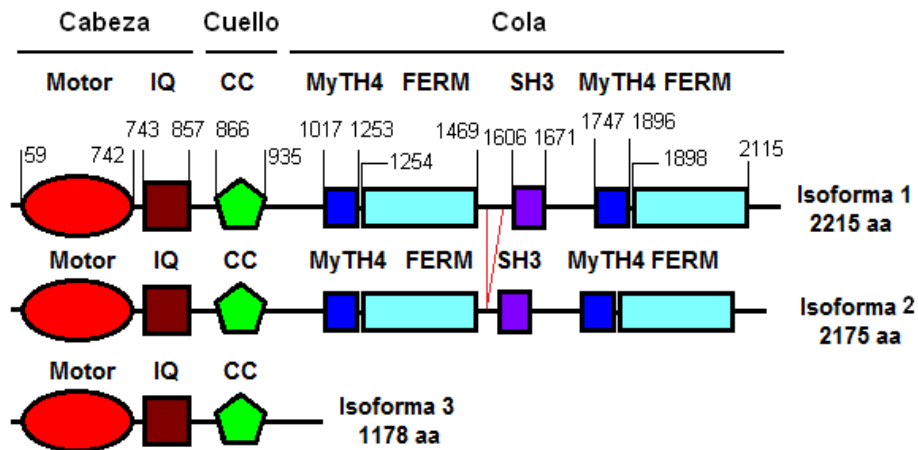


Figura 9. Dominios funcionales de las distintas isoformas de miosina VIIa.

La proteína miosina VIIa contiene diferentes dominios (Figura 9):

- **Un dominio motor** (aminoácidos 59-742) por el que se une a actina (proximidades aminoácido 632), que incluye un sitio de unión a ATP (158-165). La hidrólisis de ATP le permite desplazarse a lo largo de los filamentos de actina.
- **Cinco motivos IQ** formados por los aminoácidos IQxxxRGxxxR (743-857), que están implicados en unión a calmodulina.
- **Un dominio CC** Coiled Coil, (866-935) implicado en la homodimerización.
- **Dos dominios MyTH4** Mysin Tail Homology 4, (1017-1253 y 1747-1896)
- **Dos dominios FERM** Four protein, Ezrin, Radixin and Moesin, (1254-1469 y 1898-2115). Los dominios MyTH4-FERM sirven para interaccionar con otras proteínas (como vezatina o SANS) [Wu et al., 2011].
- **Un dominio SH3** Src Homology 3, (1606-1671).

En las miosinas se diferencian tres zonas: la cabeza, que incluye el dominio motor y los motivos IQ, el cuello con el dominio CC, y la cola formada por la parte restante. La miosina VIIa realiza su función en forma de homodímero (Figura 10).

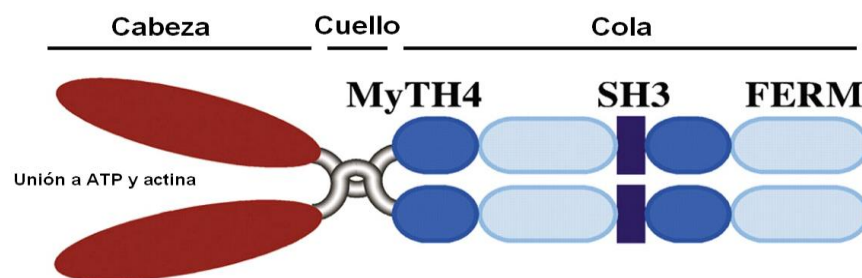


Figura 10. Estructura cabeza-cuello-cola de miosina VIIa dimerizada.

Las miosinas son motores moleculares dependientes de actina que regulan muchos procesos, como la organización de los filamentos de actina en el citoesqueleto, la regulación de la tensión de los filamentos de actina y el transporte de orgánulos. La familia de las miosinas se divide en dos grupos: convencionales y no convencionales. Las miosinas convencionales se encargan de regular la contractibilidad de los filamentos de actina, mientras que las miosinas no convencionales tienen funciones más variadas en la célula, como el tráfico de vesículas o la endocitosis. La miosina VIIa pertenece al grupo de miosinas no convencionales.

En el oído interno el gen *MYO7A* sólo se expresa en las CC. La miosina VIIa es intracelular y se localiza mayoritariamente bajo las uniones adherentes a lo largo de los estereocilios y en la placa cuticular (Figura 5) [Maniak, 2001]. En las uniones basales, los dímeros de miosina VIIa interactúan por la cabeza con los filamentos de actina y por la cola con vezatina, *Vlgr1*, usherina y whirlina [Michalski et al., 2007]. En el resto de uniones entre los estereocilios (uniones apicales o *tip links* y uniones intermedias), los dímeros de miosina VIIa se unen por la cabeza a los filamentos de actina, y por la cola, a través de los dominios MyTH4-FERM a SANS. A su vez SANS se une a harmonina y ésta a la región C-terminal de las otocadherinas (protocadherina-15 y cadherina-23). Estos complejos son necesarios para estabilizar las uniones entre los estereocilios [Reiners et al., 2006] (Figura 7). En la placa cuticular se encuentra también unida a actina e interviene en la despolimerización de los filamentos de actina [Prosser et al., 2008].

La miosina VIIa también se encuentra en el epitelio de la retina donde juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de este tejido. Transporta melanosomas dentro del tejido epitelial melánico [Liu et al., 1998] [Klomp et al., 2007]. También se encuentra en los conos y los bastones regulando el transporte de opsina [Liu, 1997a].

Defectos en este gen se asocian con sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva (DFNB2) [Liu, 1997b], dominante (DFNA11) [Liu, 1997c] y síndrome de Usher de tipo 1 [Weil et al., 1997]. La hipoacusia en estos pacientes es prelocutiva y profunda. Algunos autores han hipotetizado que la sordera DFNB2 y el síndrome de Usher USH1B son en realidad una misma patología de expresión variable [Astuto et al., 2002a], ya que en algunos casos descritos como DFNB2 una revisión clínica posterior de las familias había detectado retinosis pigmentaria. En contraste, se han publicado dos trabajos [Riazuddin et al., 2008] y [Hildebrand et al., 2010] en los que se describen dos familias grandes, de origen pakistaní e iraní respectivamente, que presentan hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva (DFNB2). Estas familias incluyen individuos de más de 60 años, en los que se ha descartado cualquier afectación retiniana.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se comprende que la correlación genotipo-fenotipo en *MYO7A* sea compleja. En general se piensa que las mutaciones truncantes y las de sustitución de aminoácido (*missense*) en el dominio motor o en otros dominios funcionales, producirían síndrome de Usher. Por el contrario, inserciones o deleciones de aminoácido(s) en fase, o mutaciones *missense* en regiones interdominios, es decir, mutaciones más leves, serían las responsables de los casos de hipoacusia no sindrómica [Rong et al., 2014].

1.5.2. *PCDH15* (DFNB23)

El gen *PCDH15* se localiza en 10q21.1 y se extiende a lo largo de 1 Mb. Inicialmente se describieron 33 exones, pero después se caracterizaron 6 exones adicionales y nuevas isoformas [Ahmed et al., 2008]. El gen *PCDH15* codifica 3 isoformas principales de la proteína protocadherina-15, que se diferencian principalmente en su Dominio Citoplasmático CD: CD1, CD2 y CD3. La isoforma CD1 es la más larga y está formada por 1962 aa. La isoforma CD2 cuenta con 1790 aa, incluye un exón extra en fase (entre los exones 11 y 12 de la isoforma CD1) y difiere en el extremo carboxilo terminal debido al *splicing* alternativo en la región 3'. La isoforma CD3 está formada por 1682 aa y también difiere de la isoforma CD1 en el extremo carboxilo. Todas las isoformas de protocadherina-15 constan de 11 dominios cadherina, un dominio transmembrana (TM) y un dominio PBM (*PDZ Binding Motif*). Este dominio, intracelular, es el que es diferente entre las isoformas CD1, CD2 y CD3 (Figura 11). Los dominios cadherina sirven para interaccionar con otros del mismo tipo y permiten a la proteína formar homodímeros y unirse a cadherina-23. Mediante el dominio PBM la protocadherina-15 interacciona con proteínas citosólicas. La protocadherina-15 se expresa en cóclea, retina, hígado, cerebro y bazo [Zubair et al., 2003].

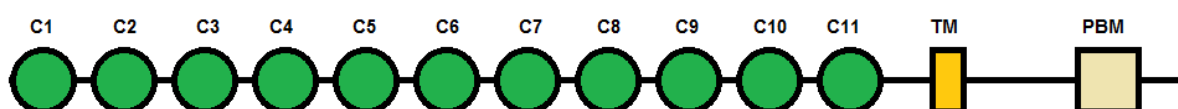


Figura 11. Dominios funcionales de protocadherina-15. Los dominios cadherina se representan con la letra C. C1: aminoácidos 69-150, C2: 179-268, C3: 309-398, C4: 431-512, C5: 536-618, C6: 643-720, C7: 144-822, C8: 846-929, C9: 953-1039, C10: 1060-1147, C11: 1171-1255, TM (dominio transmembrana): 1380-1402. Región intracelular: 1403-1962.

La protocadherina-15 forma parte de la familia de las cadherinas, que son proteínas de adhesión celular. La estructura de las cadherinas depende del calcio extracelular [Reiners et al., 2006]. La unión de iones calcio a los dominios cadherina confiere rigidez a

la proteína y de esta forma los dominios son capaces de interaccionar con otros del mismo tipo. En primer lugar la proteína forma dímeros y luego ya se puede unir a otras proteínas dimerizadas formando las adhesiones. De esta forma se une un dímero de protocadherina-15 a otro de cadherina-23.

En ratón se ha observado que en etapas tempranas del desarrollo las uniones protocadherina-15/cadherina-23 se encuentran en las uniones intermedias, en las uniones kinociliares y en las uniones apicales (*tip links*) (Figura 5). La isoforma CD1 se ocupa de las uniones basales de los estereocilios. La isoforma CD2 se distribuye por toda la longitud de los estereocilios durante el desarrollo de las CC y también es el componente de las uniones kinociliares, pero no está presente en las CC maduras. Durante el desarrollo de las CC la isoforma CD3 se encuentra mayoritariamente en la parte apical de los estereocilios, y en las CC maduras se mantiene en los *tip links* [Pan and Zhang, 2012]. En estos enlaces los dímeros de protocadherina-15 se encuentran asociados al canal de potasio mecanotransductor [Reiners et al., 2006] (Figura 7). Protocadherina-15 interacciona con los filamentos de actina a través de la harmonina [Reiners et al., 2005].

En la retina, protocadherina-15 y cadherina-23 se localizan mayoritariamente en la capa externa de la retina, concretamente en la región de la sinapsis de los fotorreceptores [Lagziel et al., 2009], probablemente mediando uniones de los fotorreceptores con las células horizontales, bipolares y ganglionares [Kremer et al., 2006]. Hay mayor proporción de estas proteínas en conos que en bastones [Ahmed et al., 2003].

Las mutaciones en *PCDH15* pueden producir tanto HNSAR (DFNB23) como síndrome de Usher tipo 1 (USH1F) [Alagramam, 2001] [Ahmed et al., 2001 y 2003]. La hipoacusia de estos pacientes es profunda y prelocutiva. Se han asociado mutaciones graves (*nonsense* o *frameshift*) a síndrome de Usher 1 y mutaciones leves (*missense* o *inserciones/delecciones en fase*) a HNSAR [Ahmed et al., 2003].

1.5.3. *CDH23* (DFNB12)

El gen *CDH23* se localiza en 10q22.1, próximo a *PCDH15*, abarca 420 Kb de ADN y contiene 69 exones (68 de ellos, codificantes). Se han identificado 3 tipos de isoformas codificadas por *CDH23*, las isoformas a, b y c. La isoforma más larga (isoforma a) está formada por 3354 aa y está constituida por 27 dominios cadherina, un dominio transmembrana y un dominio PBM (*PDZ binding motif*). Las isoformas de tipo b sólo tienen 7 dominios cadherina, mientras que las isoformas c sólo mantienen la porción intracelular [Pan and Zhang, 2012]. Estos 3 tipos de isoformas pueden contener o no la región

codificada por el exón 68 (35 aa). Las isoformas de oído llevan siempre este fragmento mediante el cual la cadherina-23 se une a la harmonina [Wu et al., 2012] (Figura 12).

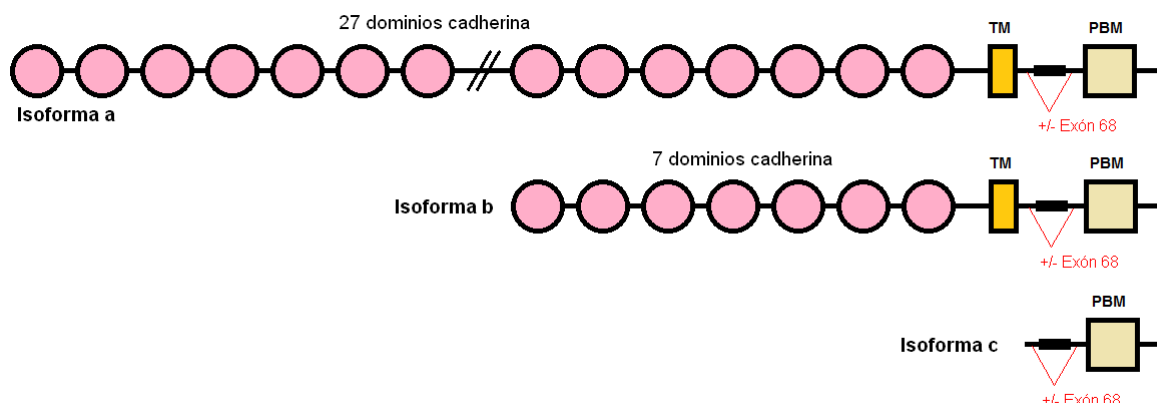


Figura 12. Isoformas de la cadherina-23. TM es el dominio TransMembrana y PBM (PDZ Binding Motif) el dominio por el que se une a proteínas citosólicas.

La cadherina-23 se expresa en cóclea, retina, cerebro, riñón, músculo estriado, músculo esquelético y sangre [Patrick, 2004].

La cadherina-23 forma homodímeros y se une a la protocadherina-15 formando uniones en los estereocilios de las CC, como ya se ha descrito, y por la región intracelular se une a harmonina. La cadherina-23 es necesaria tanto para el desarrollo de las células ciliadas (las uniones entre los estereocilios ayudan a la correcta disposición de éstos en las CC) como para la mecanotransducción en las CC maduras, porque forma parte de los *tip links* asociados al canal de mecanotransducción.

Las mutaciones en *CDH23* pueden producir tanto HNSAR (DFNB12) como síndrome de Usher tipo 1 (USH1D) [Bolz et al., 2001] [Bork et al., 2001].

Para las mutaciones en el gen *CDH23* se ha determinado una correlación genotipo-fenotipo [Schwander et al., 2009] similar a la establecida en *PCDH15*, de forma que mutaciones graves producirían síndrome de Usher 1 y mutaciones leves (*missense* en posiciones de la proteína no fundamentales) sordera no sindrómica. Es decir, no se ha descrito ninguna mutación *nonsense* o *frameshift* en estos genes causante de sordera no sindrómica.

1.5.4. *PJVK* (DFNB59)

El gen *PJVK*, también denominado *DFNB59*, se localiza en 2q31.2 y abarca 10 kb de ADNg. Está formado por 7 exones y codifica la pejvakina, una proteína de 352 aminoácidos. El análisis bioinformático de esta proteína indica que consta de una señal

de localización nuclear (aminoácidos 249-258) y un dominio similar a los *zinc-fingers* (aminoácidos 305-331) [Delmaghani et al. 2006].

La pejavakina pertenece a una familia de proteínas donde se incluyen DFNA5 (implicada en HNSAD), las gasderminas y la proteína MLZE (*melanoma-expressed, leucine zipper-containing extranuclear factor*). Se desconoce la función celular que lleva a cabo esta familia de proteínas, aunque un estudio reciente sugiere que al menos algunas de ellas están relacionadas con regulación de la autofagia [Tamura et al., 2007].

En ratón se ha visto expresión de pejavakina en todos los tejidos investigados (cerebro, ojo, oído interno, corazón, pulmón, riñón, hígado, intestino, testículo y músculo esquelético). En el oído interno murino se ve expresión de pejavakina en las células ciliadas y en las células de soporte del órgano de Corti, en las neuronas del ganglio espiral, en las zonas sensoriales del vestíbulo y en la vía aferente auditiva [Delmaghani et al. 2006] [Schwander et al., 2007]. Pero el patrón de expresión de pejavakina en ratón no parece ser completamente extrapolable al humano, ya que un estudio reciente de inmunohistoquímica en cóclea humana ha revelado expresión de *PJVK* en las neuronas del ganglio espiral pero no en el órgano de Corti [Liu et al., 2013].

La función de la pejavakina puede estar relacionada con la propagación de la señal neuronal o con el tráfico intracelular [Delmaghani et al., 2006].

Las mutaciones en *PJVK* producen HNSAR tipo DFNB59 en algunos casos con Neuropatía Auditiva (NA) [Delmaghani et al. 2006]. Hasta la fecha sólo se han descrito 14 mutaciones en este gen en familias con HNSAR. De todas ellas, solamente la mutación *missense* c.547C>T/p.R183W [Delmaghani et al. 2006], identificada en 3 familias iraníes en homocigosis, ha producido un fenotipo de HNSAR con NA. Para poder esclarecer la relación genotipo-fenotipo hace falta estudiar más familias con HNSAR con o sin NA

2. OBJETIVOS

Los objetivos que nos propusimos en este trabajo fueron los siguientes:

1. Investigación del espectro y de la frecuencia de mutaciones de los genes *MYO7A* (miosina VIIa), *PCDH15* (protocadherina-15), *CDH23* (cadherina-23) y *PJVK* (pejvakina) en una cohorte de 140 casos familiares españoles de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva.
2. Investigación del espectro y de la frecuencia de mutaciones de los genes *PCDH15* (protocadherina-15) y *CDH23* (cadherina-23) en una cohorte de 80 casos esporádicos de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva.
3. Investigación del espectro y de la frecuencia de mutaciones del gen *PJVK* (pejvakina) en una cohorte de 84 casos esporádicos de neuropatía auditiva aislada.
4. Evaluación de un panel de secuenciación masiva de genes de hipoacusia no sindrómica como herramienta de prefiltrado para descubrir mutaciones en genes conocidos en casos familiares destinados a la posterior secuenciación de sus exomas completos.
5. Identificación de nuevos genes implicados en las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas mediante secuenciación de exomas completos.
6. Investigación de la expresión de los genes implicados en las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas en tejidos de fácil muestreo (sangre, orina, saliva).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Selección de pacientes

Se seleccionaron familias españolas no emparentadas entre sí, con al menos dos individuos afectados en la misma fratría de hipoacusia no sindrómica compatible con un patrón de herencia autosómico recesivo. El examen de la historia clínica descartó posibles causas ambientales de la hipoacusia, así como la existencia de otros signos clínicos asociados, sugerentes de un trastorno sindrómico. Se incluyeron en el estudio 140 casos familiares. Tras realizar el cribado para mutaciones en el locus DFNB1, el número de familias en estudio se redujo a 77. Además estudiamos 80 casos españoles esporádicos con HNSAR, en los que tan sólo un individuo de la familia presentaba hipoacusia. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes en el estudio (pacientes y familiares sanos).

3.2. Extracción de ADN

A cada paciente se le extrajeron 12 mL de sangre por punción venosa, recolectándola en tubos con EDTA como anticoagulante. A partir de 5 mL de sangre se extrajo el ADN utilizando el robot *Chemagic Magnetic Separation Module I* (Chemagen). El resto de la sangre se guardó congelada a -20 °C para permitir una posible segunda extracción en caso de degradación o agotamiento de la primera muestra de ADN. Tras la extracción de ADN se analizó su concentración y pureza con un espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific) y se comprobó su integridad por electroforesis en un gel de agarosa. El volumen de ADN obtenido tras cada extracción suele ser aproximadamente 0,5 mL a una concentración de unos 200 ng/μL. Las muestras de ADN se conservan a 4 °C.

3.3. Extracción de ARN

Se extrajo ARN de tres tejidos de fácil muestreo: sangre, orina y saliva.

3.3.1. Extracción de ARN de sangre

A cada individuo se le extrajeron 5 mL de sangre por punción venosa, recolectándola en tubos *Paxgene*. Estos tubos contienen estabilizadores de ARN que lo mantienen estable varios días a temperatura ambiente. Para la extracción de ARN se utilizó el kit de purificación por columnas de *Preanalytix*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se comprobó la concentración y pureza del ARN obtenido con un espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific) y se conservó a -80 °C hasta su utilización. Se obtienen de cada tubo *Paxgene* (con capacidad para 2,5 mL de sangre), 60 μL de ARN a una concentración media de 50 ng/μL.

3.3.2. Extracción de ARN de saliva

Se utilizaron los *kits* comerciales *Oragene RNA (DNA Genotek)* para la recolección de la muestra de saliva. La extracción del ARN se realizó con el *kit RNeasy Microkit (Qiagen)* siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad de ARN obtenida es bastante variable, entre 20 ng/μL y 800 ng/μL en un volumen de 14 μL, dependiendo del individuo.

3.3.3. Extracción de ARN de orina

Se hizo recolección de la primera orina de la mañana en botes estándar de 100 mL. Para la extracción de ARN de orina se utilizó el *kit* comercial *ZR Urine RNA Isolation Kit*. Los filtros incluidos en el *kit* tienen poca superficie, lo que obligaba a filtrar pequeños volúmenes de orina, y se obtenían pequeñas cantidades de ARN. Por esta razón, los sustituimos por los filtros *Whatman 25mm GD/X GE Healthcare 1,6 μm*. Se pasó la orina por el filtro hasta la saturación de éste, siendo el volumen filtrado muy variable entre individuos y días. Debido al cambio de modelo de filtro tuvimos que modificar parcialmente el protocolo del fabricante añadiendo en el segundo paso de extracción 2 mL de *Urine RNA Buffer* (en lugar de 700 μL) y añadiendo en el tercer paso un volumen de etanol absoluto de 2 mL (en lugar de 700 μL). Además añadimos un paso de tratamiento con *DNase I* (para eliminar el ADNg), en los protocolos de purificación de sangre y saliva ya está presente esta purificación. Se obtuvieron 12 μL de ARN a una concentración media de 200 ng/μL.

3.4. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Los cebadores se diseñaron con el programa bioinformático *OLIGO6*, tratando de que las temperaturas de amplificación fueran las mismas para todos los exones de cada gen, en la medida de lo posible. El MgCl₂ se utilizó a concentraciones finales diferentes (1,0 1,5 y 2,0 mM) según el resultado de las pruebas de amplificación. En cada PCR se incluyó una muestra sin ADN como control negativo de amplificación. Los termocicladores utilizados fueron del modelo *9700 de Applied Biosystems*.

3.4.1. Fragmentos pequeños (<1.000pb)

Se utilizó la enzima *FastStart Taq Polimerasa (Roche)*.

La mezcla de reacción (en un volumen final de 15 μL) para cada muestra fue la siguiente:

Reactivo	Volumen
H ₂ O destilada inyectable	6,35 µL
Tampón 10x (<i>Roche</i>)	1,5 µL
MgCl ₂ 10mM, 15mM o 20mM (Diluciones de MgCl ₂ 25mM de <i>Roche</i>)	1,5 µL
dNTPs 1,25mM (<i>Roche</i>)	2 µL
Cebador directo 10 µM (<i>Sigma</i>)	1 µL
Cebador inverso 10 µM (<i>Sigma</i>)	1 µL
Enzima <i>FastStart</i> 5U/µL (<i>Roche</i>)	0,15 µL
ADN (20-50ng/µL)	1,5 µL

El programa del termociclador fue el siguiente:

30 ciclos	96 °C	5 minutos (activación de la enzima y desnaturalización inicial)
	94 °C	40 segundos (desnaturalización)
	T °C	40 segundos (hibridación o <i>annealing</i>) ¹
	72 °C	20, 30 o 40 segundos (extensión) ²
	72 °C	7 minutos (extensión final)
	12 °C	Conservación de muestras hasta la recogida

En algunos casos, para aumentar la especificidad del amplificado, se empieza con una temperatura superior en 5 °C a la temperatura óptima de hibridación, programando 5 ciclos donde se baja un grado la temperatura en cada uno (*touch down*); luego se programan 25 ciclos a la temperatura óptima. Se utilizó el siguiente programa:

25 ciclos 5 ciclos	96 °C	5 minutos (activación de la enzima y desnaturalización inicial)
	94 °C	40 segundos (desnaturalización)
	(T+5 °C) → (T+1°C)	40 segundos (hibridación en <i>touch down</i>)
	72 °C	20, 30 o 40 segundos (extensión) ²
	94 °C	40 segundos (desnaturalización)
	T °C	40 segundos (hibridación)
	72 °C	20, 30 o 40 segundos (extensión) ²
	72 °C	7 minutos (extensión final)
	12 °C	Conservación de muestras hasta la retirada del aparato

¹ La temperatura de hibridación (T) varía de unas a otras parejas de cebadores (entre 55 °C y 72 °C en nuestras muestras).

² El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento: para fragmentos <300 pb, 20 segundos; para fragmentos >300pb y <500pb, 30 segundos; y para fragmentos >500 pb, 40-60 segundos.

En los casos de secuencias con alto contenido en GCs (guanina y citosina), se utilizó el tampón *GC-rich 5x* (Roche) para mejorar el amplificado, añadiendo 3 µL por reacción y descontando este volumen al agua, manteniendo el volumen final en 15 µL.

3.4.2. Fragmentos grandes (>1.000pb)

Para las PCRs de más de 1.000 pares de bases se utilizó la mezcla enzimática *LA Taq DNA* polimerasa (Takara). Esta mezcla combina *Taq DNA* polimerasa y una polimerasa con actividad exonucleasa 3'-5', que en conjunto consiguen aumentar 6,5 veces la fidelidad, de modo que con este sistema se pueden amplificar con bastante exactitud fragmentos de hasta 20 kb.

La mezcla de reacción para cada muestra en un volumen final de 25 µL, fue la siguiente:

Reactivo	Volumen
H ₂ O destilada inyectable	12,25 µL
Tampón 10x (Takara)	2,5 µL
MgCl ₂ 25 mM (Takara)	2,5 µL
dNTPs 2,5 mM cada uno (Takara)	4 µL
Cebador directo 10 µM (Sigma)	1 µL
Cebador inverso 10 µM (Sigma)	1 µL
Enzima Takara LA polimerasa 5U/µL	0,25 µL
ADN (20-50ng/µL)	1,5 µL

Y el programa del termociclador fue:

	94 °C	2 minutos (activación de la enzima)
30 ciclos	94 °C	30 segundos (desnaturalización)
	68 °C	X minutos (hibridación y extensión) ³
	72 °C	10 minutos (extensión final)
	12 °C	Conservación de las muestras hasta la retirada del aparato

³ El tiempo es variable dependiendo de la longitud del fragmento. Se suele utilizar 1 minuto por cada kilobase amplificada; por ejemplo, para un fragmento de 8,5 kb, programaremos 8 minutos y 30 segundos.

3.5. Retrotranscripción

Para sintetizar una cadena complementaria de ADN (ADNc) a partir de ARN se utilizó la transcriptasa inversa *SuperScript II RT (Lifetech)*.

La síntesis de ADNc se realizó siguiendo estos pasos:

- 1) En tubos de PCR (de 200 µL, con tapa individual) se preparó la siguiente mezcla por duplicado para cada ARN a estudiar, se calentó a 65 °C durante 5 minutos y rápidamente se enfrió en hielo.

Reactivo	Volumen
Cebadores Random p(dN) ₆ 100 µM (<i>Roche</i>)	1 µL
dNTPs (10mM cada uno) (<i>Roche</i>)	1 µL
300 ng de ARN	Hasta 10 µL
H ₂ O libre de RNasas	Completar volumen final de 12 µL

- 2) Después se añadió a cada tubo lo siguiente, y se incubó 2 minutos a 25 °C.

Reactivo	Volumen
Tampón 5X <i>First Strand (Lifetech)</i>	4 µL
DTT 0,1M (<i>Lifetech</i>)	2 µL
Inhibidor de RNasas <i>RNase OUT</i> 40 U/ µL (<i>Lifetech</i>)	1 µL

- 3) Se añadió 1 µL de *SuperScript II RT* (200 U) (*Lifetech*) a uno de los dos tubos de cada muestra. El otro tubo, sin enzima retrotranscriptasa, se utiliza para comprobar que en las PCRs posteriores realizadas sobre el ADNc no estamos amplificando genómico residual.
- 4) Finalmente, se incubó en un termociclador *Applied Biosystem Gene Amp PCR System 9700* a 25 °C durante 10 minutos, a 42 °C 50 minutos y a 70 °C 15 minutos. Los ADNc obtenidos se conservan a -20 °C.

3.6. Genotipado con marcadores microsatélites

En los casos familiares seleccionados para el estudio, se realizó un análisis de haplotipos para investigar un posible ligamiento gen-enfermedad.

Los microsatélites se caracterizan por ser secuencias del genoma cortas (1-10 pares de bases) que se repiten en tándem un cierto número de veces, siendo una secuencia típica de microsatélite (CA)_n. Por ser altamente polimórficos (el número de repeticiones es muy

variable) y por encontrarse distribuidos por todo el genoma, son unos excelentes marcadores genéticos. Con las técnicas que explicaremos en detalle a continuación, hemos podido discriminar el tamaño de los diferentes alelos de cada marcador microsatélite en cada individuo. Con estos datos y con ayuda de los árboles genealógicos, se construyen los correspondientes haplotipos y se estudia si haplotipos específicos están asociados o no con la hipoacusia. En las familias estudiadas, si los dos hijos enfermos tienen los mismos haplotipos y éstos son distintos de los que llevan los hijos sanos, existe compatibilidad con ligamiento (Figura 13). No es ligamiento propiamente dicho porque las familias estudiadas son pequeñas y el número de afectados es insuficiente para alcanzar una certeza estadística; pero esta aproximación es muy valiosa para el estudio de familias pequeñas.

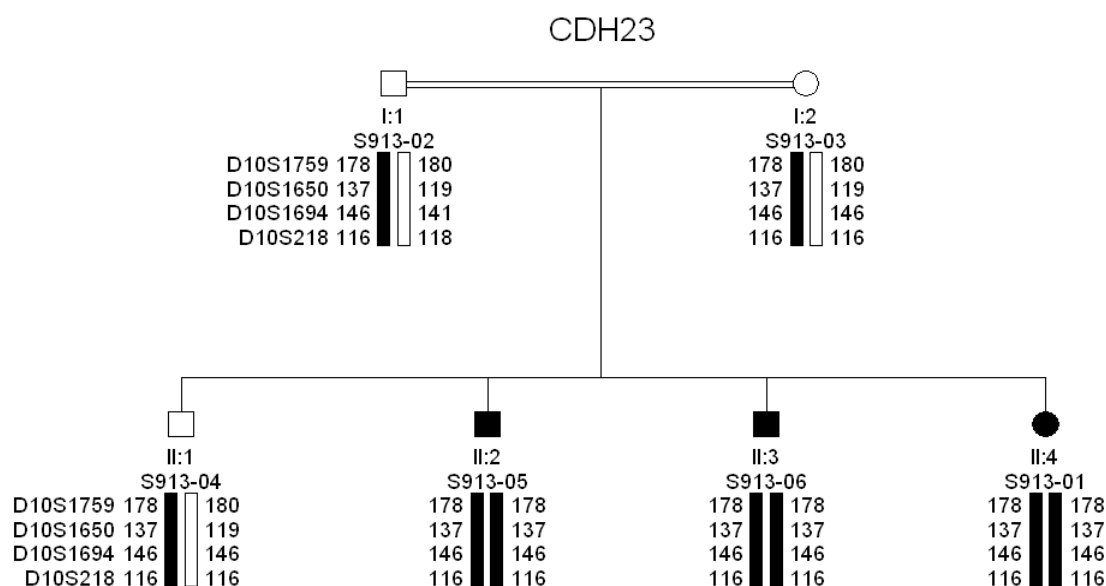


Figura 13. Ejemplo de haplotipado con marcadores microsatélites cercanos al gen CDH23. La familia S913, consanguínea, muestra compatibilidad de ligamiento, puesto que los tres hermanos afectados han heredado los mismos haplotipos de los padres y son distintos del hermano sano. Además los haplotipos son idénticos para ambos alelos por lo que si mutaciones en este gen fueran la causa de la hipoacusia en la familia se esperaría encontrar una mutación en homocigosis.

Para el estudio de ligamiento se buscaron en *Map Viewer* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), marcadores de tipo microsatélite próximos al gen en estudio (comprobando la heterocigosis en *The Genethon Human Genetic Linkage Map* [Gyapay et al., 1994]). Los cebadores que limitan la región del microsatélite se encargaron a *SIGMA*, marcando el extremo 5' del cebador directo con fluorescencia HEX (5-hexacloro fluoresceína) o FAM (6-carboxi-fluoresceína). Según los tamaños de los microsatélites, marcamos con un fluoróforo u otro para que los que tengan tamaños parecidos vayan en colores diferentes y así poder diferenciarlos, ya que en el último paso se juntan todos los marcadores para cada individuo en un único tubo.

Se amplificaron por PCR los 3 o 4 marcadores microsatélites para un gen, a una temperatura de hibridación de 58 °C; se comprobaron los amplificados en un gel de agarosa al 1,5%; a continuación, para cada individuo se mezclaron en un tubo nuevo 2 µL de cada amplificado, se añadió agua para llegar a un volumen total de 20 µL, y de la mezcla se pasó 1 µL a un nuevo tubo y se añadieron 12 µL de Formamida (desnaturalizante) (*Applied Biosystems*) y 0,2 µL de un estándar de fragmentos de tamaño conocido marcados con el fluoróforo ROX (carboxi-X-rodamina) (*Applied Biosystems*). La máquina utilizada para el análisis de microsatélites emplea electroforesis capilar (*3130 Genetic Analyzer, ABI PRISM, Applied Biosystems*).

A continuación se indican los marcadores microsatélites utilizados para los genes estudiados específicamente en este trabajo: *MYO7A* (Tabla 2), *PCDH15* (Tabla 3), *CDH23* (Tabla 4) y *PJVK* (tabla 5); así como las parejas de cebadores que delimitan el microsatélite, el tamaño del amplificado, la posición en el cromosoma y el marcaje que hemos empleado.

Tabla 2. Marcadores cercanos al gen *MYO7A*.

Nombre	Tamaño (pb)	Pareja de cebadores 5'-3'	Marcaje	Posición en el cromosoma	Región
D11S4081	166-202	GCCAGACTATGGGGAG GGCCTTGGGTGAATTA	HEX	75196447-75196640	11q13.4
D11S4179	200-256	GGATGTAAGAGTAACTG GAAAATGTTCTGCCTGAGGG	FAM	76396260-76396495	11q13.5
MYO7A				76839302-76926286	11q13.5
D11S4186	156-175	ATTCTCCCAATCTATCG GGGCAGTAATGATGATGTG	FAM	76968518-76968685	11q13.5
D11S1789	208-252	ACCAGGAAATTGAGAACC TCTGGCCCAACAGAAGT	HEX	77035678-77035923	11q13.5

Tabla 3. Marcadores cercanos al gen *PCDH15*.

Nombre	Tamaño (pb)	Pareja de cebadores 5'-3'	Marcaje	Posición en el cromosoma	Región
D10S1226	125-149	AGCCACCAGAGGAAGTAAGG AGTGCTGCCAAAAGAAATTG	HEX	57529868-57530002	10q21.1
D10S1124	195-235	CCATGGAGCATGTCTTATTT CCACAGATTGTGAAAGATGAC	HEX	57088634-57088859	10q21.1
PCDH15				56561051-55580860	10q21.1
D10S107	155-167	GAATCCATAGCTGTACTCCA AATTGTCTATGGTCCCAGCA	FAM	54160789-54160947	10q21.1
D10S567	~95pb	TAAGCCTAGTCAACTTAACAAGAC AAAAGTGACTTAGTGTTGATCA	FAM	53915563-53915657	10q21.1

Tabla 4. Marcadores cercanos al gen *CDH23*.

Nombre	Tamaño (pb)	Pareja de cebadores 5'-3'	Marcaje	Posición en el cromosoma	Región
D10S1759	160-192	TGCACAACCTGGGGAACT TGGGCACGCTCACACT	HEX	73059749-73059930	10q22.1
D10S1650	104-148	GAAGCCTGTGGTCTAATGAG TTCTGGCCTCTGCAGC	FAM	73293214-73293351	10q22.1
CDH23				73156691-73575704	10q22.1
D10S1694	121-160	CCTGTCTGGCCCAGGTA AGTAGGGGTGCTGCTTGA	HEX	73427079-73427219	10q22.1
D10S218	124	TCTCCAGTTGCAGTCTATTTT TCTCTGTCTCTCTACCAACCC	FAM	73756105-73756460	10q22.1

Nótese que el marcador D10S1650 es intragénico.

Tabla 5. Marcadores cercanos al gen *PJVK*.

Nombre	Tamaño (pb)	Pareja de cebadores 5'-3'	Marcaje	Posición en el cromosoma	Región
D2S148	148-200	CTTATGCTAAAGTGTAAAGGGTATCT ATGAAGGAATACTGGCTTGT	FAM	178231423- 178231607	2q31.2
D2S2173	227-243	GGAGACAGAGAGTTTACATTTGAG GCCACACTTTCCTGAATC	HEX	178445536- 178445768	2q31.2
PJVK				178451436- 178461390	2q31.2
D2S324	265-275	TTACCCACCGGGACAGT CAGCAAATGCTTCTAGGTCA	HEX	179656363- 179656494	2q31.2
D2S2310	244-260	TTACCCACCGGGACAGT CAGCAAATGCTTCTAGGTCA	FAM	182166459- 182166706	2q31.2

3.7. Secuenciación del ADN

Se utilizó el método de secuenciación con dideoxinucleótidos como terminadores de amplificación descrito por Sanger [Sanger et al., 1977]. La secuenciación se realizó directamente sobre los amplificadores de PCR. En primer lugar se purificó el ADN con *ExoSAP-IT* (USB, *Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase*), que es una mezcla de fosfatasa alcalina y de exonucleasa I; las cuales van a actuar, respectivamente, eliminando los dNTPs sobrantes de la PCR anterior y eliminando las cadenas de DNA de hebra simple (cebadores). Se mezclaron 5 µl de amplificado de PCR con 2 µl de *ExoSAP-IT* y se incubaron en un termociclador a 37 °C durante 15 min y a 80 °C durante otros 15 min. Después se hicieron las reacciones de secuencia, añadiendo a cada muestra:

Reactivo	Volumen
H ₂ O destilada inyectable	11,25 µL
Tampón (<i>Applied Biosystems</i>)	4 µL
<i>Big Dye Termination Kit (Applied Biosystems)</i> ⁴	1,75 µL
Primer directo o inverso (<i>Sigma</i>)	1 µL
Amplificado purificado con <i>ExoSAP-IT</i>	2 µL
Volumen total	20 µL

La mezcla se introdujo en un termociclador con el siguiente programa:

	94 °C	3 minutos (activación de la enzima)
25 ciclos	96 °C	10 segundos (desnaturalización)
	50 °C	5 segundos (hibridación)
	60 °C	4 minutos (extensión)
	12 °C	Conservación de muestras hasta la retirada del aparato

El producto de la reacción de secuencia se purificó mediante precipitación con el método acetato-etanol. Para ello, se añadieron a los 20 µL de reacción de secuencia de cada muestra:

Reactivo	Volumen
Acetato sódico 3M pH 4,6	3 µL
Etanol absoluto	62,5 µL
H ₂ O	14,5 µL

Se pasaron las muestras a tubos *ependorf* de 1,5 mL y se mantuvieron 15 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron a 12.000 rpm (16.000 g aprox.) durante 20 min, de forma que el ADN quedase adherido al fondo, y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 250 µL de etanol al 70 % (con objeto de lavar el precipitado de ADN) y se centrifugó de nuevo a 12.000 rpm durante 5 min, volviendo a desechar el sobrenadante. A continuación se secaron las muestras mediante vacío y centrifugación (*Thermo SAVANT*) durante 30 min. Las reacciones de secuenciación se resolvieron en un secuenciador *3130 Genetic Analyzer, ABI PRISM, Applied Biosystems* y se analizaron con el programa informático *Sequencing Analysis v5.1.1* (*Applied Biosystems*). Las secuencias se examinaron con los programas informáticos *SeqMan (DNASTAR)* y *Chromas Lite*. Los cambios encontrados se investigaron en las bases de datos de *Ensembl* www.ensembl.org [Flicek et al., 2014] y *NCBI* www.ncbi.nlm.nih.gov [Geer et al., 2010] para comprobar si

⁴ Lleva ddNTPs marcados, dNTPs, Taq polimerasa, tampón y MgCl₂.

estaban descritos y para examinar sus frecuencias en las diferentes poblaciones. La nomenclatura de las mutaciones identificadas en este trabajo se revisó con el programa *Mutalyzer* (<https://mutalyzer.nl/>) [Wildeman et al., 2008].

En las siguientes tablas se indican los cebadores y condiciones utilizadas para la amplificación y secuenciación de los exones (y regiones intrónicas flanqueantes) de los genes *MYO7A* (Tabla 6), *PCDH15* (Tablas 7 y 8), *CDH23* (Tabla 9) y *PJVK* (Tabla 10). Se utilizó en general el cebador directo para la secuenciación. En caso de fragmentos muy grandes, o cuando la secuencia no era clara, se secuenciaron ambas hebras.

Tabla 6. Cebadores y condiciones utilizadas para la amplificación de *MYO7A*

Exón	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	Temperatura hibridación/ MgCl ₂
1	CTGAGCAGCCTCTGGACATT	TCGGGACAGTTTCATTCACTG	63 °C/10mM
2	GAGAGAAGCCAAGGAGGGTTC	GCACAGCAGAGGGAACAGG	63 °C/10mM
3	CCTTGTGTGGTTGGCTCAGA	AGAGGCAGAAGTGGGGGC	63 °C/10mM
4	GCGGTCCTTGAGGGGTA	GCACAGCGGACAAAGTGTC	63 °C/10mM
5	CACATGACTCCAAAGCCAGG	GGGGGCAATTCCTAGAGGTATC	63 °C/10mM
6/7	AAGGTGAAGGAGAGTGCGGT	CAGCAATACGGGCAGGTG	63 °C/10mM
8	GCCTGCTCCCTCTGTGCT	GCCCTGTGACCACTGAGACC	63 °C/10mM
9	CAGGCAGCCAGGCACTG	TCAAATCTACCCACAGGCGAA	63 °C/10mM
10	CGGCAGCAGGAGTGGCAG	ACATCCCAGCCCCCAATGAG	63 °C/10mM
11	GTGGAGGCAGTGGTCTGG	CACCTGCCCATCAAGAGC	63 °C/15mM
12	CACACGGCACTTTGTTCCACA	TGAGGGACACGAGGGGATG	63 °C/15mM
13	CCTCGCCTCTGAGTTTGGAGTC	GCTCAAAGCAGGGAAGGAAGC	63 °C/15mM
14	AGAGACAGGGGGCAAAGACA	GTTTGGGGCGGTGAGAAAG	63 °C/15mM
15	TGGCTCAGATGTTATGGGTTTGG	AGGGCAGGGCTTAGACTCAGG	63 °C/15mM
16	CCCCTCCCGCTTCCTACT	AGGCTCTTTCCAAGGCACC	63 °C/15mM
17	GCCTTTGTCTGGGTTGGTCA	GAGGTCAAGCAGATGTCAAGCC	63 °C/15mM
18	TCAGCCTCGGGGACACTC	CCAGCCACACCACAGCC	63 °C/10mM
19	GGAAGAGCAGCCCCACT	AGAGGAGAGCCAAACACCACAC	63 °C/15mM
20	GACTCAGCGTGCCCTCCTG	AAGAGCCAGATCCAGACTTCGG	63 °C/15mM
21	TTCTGGGGGTGCCTGTCT	GGATGGAAATGAGGGTCTGG	63 °C/15mM
22	TCAGAGTTGGGTGGGTGGAG	GTGACAGATGAGAAGCCAGCCT	63 °C/10mM
23	AGGAGGTGGGACTGAGG	GGCAGACAAGGAGGGAGG	63 °C/10mM
24	ACTTCTGGGCTCAGGCGA	GGGAGTGGGCTGGAGA	63 °C/10mM
25	CTGAGGGCTGACCATGCG	AGGGGTGGGTGAGGCAGA	63 °C/15mM
26	GTGGACGGTGGCAGTGTG	CCAAGACCCCTGAGGACAGAC	63 °C/15mM
27	TTTTCTGGGGAGCAGGCA	GCTAGGTTGACAGAGGCACCA	63 °C/15mM
28	GGCAAGTTGGAGAGGACAGC	GGAGTGTGGGAAAAGAGGTG	63 °C/15mM
29	AGATGGTGGAGCTGAGAGGGT	GGGAATGTTTCTGGGGCAC	63 °C/15mM
30	ACAAGCAGTGTCCAGTGAGG	AGTTCTCGGCAGTCCTGAGG	63 °C/10mM
31	TGTCTGAAGTGACCGTTGGC	GCTAATGATGGCTCACAGAGGA	63 °C/10mM
32	ATCAGTGAGAAGCCTGGGTCC	CAGATGGAAGGAGAATGAGTGAGC	63 °C/10mM
33	AGATGGGAGCAGGGCAAG	AGCAGCATTGACCAGAGCAG	63 °C/10mM
34	AGAAATCAGTGTATTGCCACCTGC	GCCACTTCATGCCTCTTCACTT	63 °C/15mM
35	GACAGGCAAAGGAGAAGTAGGC	GCAACACAAATGGACTAAGACAGTC	63 °C/15mM
36	GTGATAACACCTCAGTTCTTCTGTGG	GTGTGTCCCATAAAGATCCCAAGA	63 °C/15mM
37	AGAGTCTCCCAGAGTCCAGAAGG	CACGACCAGACAGTAGCGGA	63 °C/15mM
38	CAGGGCAGGGAAGAGCA	CTCAGGAGGAAGGCAGTGTG	63 °C/10mM
39	TGCCCATTGTTGTGAGTGTGC	CCACCTCCAGTTCCTGCTA	63 °C/10mM
40	AGGGGTCTGTAGGTAGGGTGAG	TGCTATGTGGTCTCATCCC	63 °C/15mM
41	CTGCCTCCAAGTGTCCCG	CTGAGCCCCGACTCCACTAC	63 °C/15mM
42	GGGGGCTCAGTATAGGAGGC	CTTCCGTCTGCTGTCCGTAAG	63 °C/15mM
43/44	GGGGACACTCAGCAGGCA	CTGGCAAGGTCAAGTGGGTCTC	63 °C/20mM
45	GGGGTCTTGGTGTGGTGGGA	GAAGGATAAGGCAGGTGGAGGAACA	63 °C/10mM

Exón	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	Temperatura hibridación/ MgCl ₂
46	GGGTGGTGTGGGGAGGACT	GGGACAAGGCTGAGGGTGC	63 °C/10mM
47	CGGAGGTGGAAGCCATAGGTC	GAGCAAGCGTTGGGTAAAGTCCT	63 °C/10mM
48	GGGTGTCCAAACCAAGGTGT	CCCAGCCGCACACTACTG	63 °C/10mM
49 (1)	TTGCCTTTGTCTGGGTTCTG	CCTTCGGTTTCAGAGTATTCAATGC	63 °C/15mM
49 (2)	ACTTCCCTCCATCCACCCCT	CCCAGCAGGTTAAGACCAAAGAA	63 °C/20mM

Tabla 7. Cebadores y condiciones utilizadas para secuenciar todos los exones de la isoforma principal del gen PCDH15.

Exón	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	Temperatura hibridación/ MgCl ₂
1	GCTGTCTCCTGTATGTGCTGCG	TGTGGTTCAGTCTGCCTTAAATT	62 °C/15mM
2	ATTAAGGCTTTTCTGTGCTGTGAC	GGACATCTGATTTCACTTTTCTAAGCT	62 °C/15mM
2bis*	TGATGTGTATTATCCAGTGAATGTGT	AGCATCACAAACAGAAACAAACATAA	54 °C/20mM
3	TCCCTGCTGGTGTCTTCTCA	AGAATTAATAATCTGAAGAAAACCCCTCT	62 °C/15mM
4	ATAATGCAGATACTTTGGCCTTTTG	TGTTCCCTTCCTTTCTCATTCTTCT	62 °C/15mM
5	GAACGAGTGCTTTGACAGTGATG	CCTAAAATAACATCGGAAGTCACATAC	62 °C/15mM
6	TTAAGAACTCCTGTGTAAGGCTCAA	TAATCTGGTTCGGAAGTTACTGAATA	62 °C/20mM
7	ACTCTGGGGAAACCCATTGATC	GCCCTGATGAAGAAGTGAGTGG	62 °C/15mM
8	TTTATGGTTAGGCTGTCTAGTA	ATATGTCTACAAAATACTTGAACAT	55 °C/15mM
9	GAATACTTTGCTCCCCCTTAACATT	CCAACAAATTGAGGAAGCAAATATC	62 °C/20mM
10	ATTTGTGTCTGCTTTCCCTGA	GGCTTCGCTTATTTTCTTTTAA	62 °C/15mM
11	AATTAAGCCTCACTGGATTTT	ACTGAATATCTGCAAGCTGAA	60 °C/20mM
11bis*	AGTGTGCTGGAAGTGTTTG	AGTCAAGAAAAAAGAACAAGGAAA	54 °C/15mM
12	TCCTTTTTTCCCACATTGATT	TGTATTTTTCCCCCAAGTCAT	60 °C/20mM
13	CACCTTTTCAAATTGTAAGAT	AGTCTCCTTTAGAGTCCATATAGAT	55 °C/20mM
14	GCTTTCCTCTTTTTCCCTTTATT	CATGCCACTGACACATCTGTAA	60 °C/20mM
15	AGTTTTTCTATCCTTTCAATTT	CCCTTCATTCTCTCCTGTAA	60 °C/20mM
16	TGATTTTACACCTTGCCATTA	TTCAATTGTGCTTTTTTCTTA	60 °C/20mM
17	GTTTTGTATGTTTTGTTTCCTG	AAGAAGTTGCTCCAGATGAAA	60 °C/20mM
18	CATCATTTGCTTTTCCCATC	TAAAATGTAAATCTGTATCCTTGAAA	60 °C/20mM
19	TTGTCATTGTCAATTCCTCCTTA	TTGTATTGTTACTTGCTAATTTTGG	60 °C/20mM
20	CGTGCTTTTTTGCCTCGTTA	GAAAATCTATGTTATGGGTCTGGTA	60 °C/20mM
21	CAGTGGTAAATAAGTTATGTGATAT	TTTCATGTGATATGTTGATTTGG	60 °C/20mM
22	GTTTTGGGAGGAAGATGTAAT	GAGATCAAAACGCAAATTCTA	60 °C/20mM
23	GTGCTGTTACGCTGTTCTTAC	AAAATTGGAAGTCTACTCATAAATT	61 °C/20mM
24	ATGTGTGAGGGCAGAGGGTA	AATGAGGAAAAGGGCAAGG	61 °C/20mM
25	CCAGCATTTTGTCACTTTTCAT	TATCTATTTCCCAAGGTTTATCC	61 °C/20mM
26	TATCAGTGTCCCCTGAATTTG	CTGGAGGAATACAAACCATTA	61 °C/20mM
27	CATTTAGGAGGGCTTTATTG	TTTTGAAAACCCGTTTTAA	54 °C/20mM
28	GTGGGGGTTTTCTGATTATG	TCAACAATGGGTACATGCAG	60 °C/15mM
29	GCTGTCATCATTTTTTCATTTACT	ATAGCCTCAAGTCAGGAATCATC	60 °C/20mM
30	TCCTCTTCTTTATTGCTTATGC	AAAGCCACAGGAAGTAAGGT	61 °C/20mM
31 y 32	TGTGGGGATGCTTTTGTAAAT	TGACCCTGAGGATTGAGATATT	61 °C/20mM
32bis*	AAGTTCCTGCTCATATTTTCAGAAT	GGCAAAAGATGAAGATCACTGTAT	54 °C/15mM
33 (parte 1)	TTTCTGCCCTGCCTTTCTA	GGCAAAGTGGAGAATGAGAA	61 °C/20mM
33 (parte 2)	GGCAAGGCACACAGGCAGAAAG	AGAAGGAGGAGAGGGAGGAGGACAA	61 °C/15mM
33 (parte 3)	CCCATCCACCAACATCTCTCCTTC	AATTTTCTCGGCAGGCATCAAGTTG	61 °C/20mM
33 (parte 4)	TTTCCACTTTCCGTTTCA	GAATTTGGGGTAAAATAATAGAGTC	56 °C/25mM

*Exones descritos después del diseño de los cebadores (de ahí esta nomenclatura).

Tabla 8. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación y condiciones de PCR de los exones exclusivos de algunas isoformas de PCDH15.

Exón	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	Temperatura hibridación/MgCl ₂
33c	GTATCAAATGGTTACAGCCAGAA	AGAAAAATGGTTAAACTTTGGTTAAA	55 °C/15mM
34	TGGCGGAAGAAAAAGAAGGAAA	TGAAACGGTCAGCACTGTGAAA	59 °C/20mM
35a (1)	TGTCATTGTTTTGGATTTACAG	CAAAGCTCTTCATCATCAGACTGT	59 °C/15mM
35a (2)	TGAAAAGCACAGTTGAACAGGAGT	CAGCAGCTGTATAAACTCATTGCC	55 °C/20mM
35b (1)	CCCACAGATTCATTCTGCG	ATGTTTTTCCTTGCTTTTCTCCTTC	59 °C/20mM
35b (2)	GGAATCCTCCAGCGACTATACTGA	GCACACGAGAGCACTCATCAC	60 °C/15mM
35b (3)	AACCAAAAGAAGTCGCCAGGA	TGCCATCCATTCCAATAGACAGA	55 °C/15mM

Tabla 9. Cebadores y condiciones utilizadas para la amplificación de CDH23

Exón	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	T ^a hib/MgCl ₂
1	GGAGGTGAGGGAGGGAGCT	AGGGGAAGGAGAGGGAAGC	65 °C/20mM+GCrch
2	TCCCAGCCCCAGTTCTCTCT	AGCCCCAACACCCTCCAG	63 °C/10mM
3	GCTGCCTGCCGACCTACT	ACTGAGTGCCCTGTCCCTG	64 °C/10mM
4	TCTGCTCTCTCCCTTGGCTAC	CGTCTTCCCCCAGTGTC	63 °C/20mM
5/6	CCTCCCGCCCCATTTAG	CCCAACTGCTCTTCCCAAC	64 °C/15mM
7	GAGAATGGGCTTTGAGGGACT	CCGTCACTCTCTTCCAGGGT	64 °C/20mM
8	ATGGGTGTGTGTGTGCGT	GGAGGAGCCAAGGAGGAG	60 °C*/10mM
9	CTGATGCCTGAGCCCTTG	AGAGCCTGAGATGCCTACTGG	63 °C/25mM
10	TAATGCCCAGAGAGGAGCC	GAGAGCACGGAAGCGAAGT	64 °C/10mM
11	TTGTGGTGAGGATTAGATGGGAT	GGATGGGTGGTGGGTCTG	63 °C/20mM
12	GCCTCTGCTCCTCCATTTG	CTACCCTACCCTCGCCTCC	63 °C/10mM
13	TAGCAGAATCAGCAGCCATCC	TTTGGGGGTGCCTCCTTC	63 °C/10mM
14	CTGCTTCTGACCCGCTCCTA	AGCCACAGGACCCAGCAC	63 °C/10mM
15	CAGGGCAAGTGAAAGGGAAG	CAAGCAAGTACAGGGAGAAGGC	63 °C/10mM
16	AGTCTTCCCCACCCTCCC	CGCCTCATCCCCACAAG	63 °C/10mM
17	AGCCATAACTTCTCTGCCCAA	CAGGGACAGCCAAGGAGGT	63 °C/10mM
18	TAGCCTGACTCCTTGGTGCC	CATCCTGGGTGCCGTGA	63 °C/10mM
19	AGGGATGTGCAACAGGC	CAAACTGAAAGGAAGGGGACC	63 °C/10mM
20	TCCTTCCCTCGCTCTCTCTT	CCCCTTGCTCATTCTCAAAA	63 °C/10mM
21	GCATCTGAGCACTTTTCCCC	AGAGTCCACCAGCCCCATAG	63 °C/10mM
22	CCTCTCGGACCCCCCTAC	GGTGTCTAGGAGTCACAACTGG	63 °C/10mM
23	GCCTTCTTCTGTCCGTTTCT	TCCCTCCACATCTCCAGAGC	63 °C/15mM
24	AAGTGTGGCTTGGCAGGG	AATAGACAGCAGTGGGGGACAT	63 °C/10mM
25	TGGAGACGCTGCTCTGGA	TCACCTGCCCCCACCTAGT	63 °C/10mM
26	CAGCACAGCCTCCCACTCCT	GCCCTTCTCCACTGGCATCT	63 °C/10mM
27	GGCTAGGGCAGATGGGGC	CACAGCACCTTCCAGAGCAGC	64 °C/10mM
28	GATGCGTGAAGGGAAGGAAA	TTTGGCAGCCTAGAGAAGCTC	63 °C/10mM
29	AGAAGACCCGCAGCCTCC	GCACCTGTCAACGAACCC	64 °C/10mM
30	CCCAGGAAAGCAGTGACCA	CATCCAGCAGCCCCCTC	63 °C/10mM
31	GGGGTATGGGTGTGGCAG	CAGCCTCCAACTCCTGAGC	63 °C/10mM
32/33	TGGAAAAGTGGGCAGAATGA	TGGGAGAGGTGGGAAGGTC	63 °C/15mM
34	TCTGAGGGTTTGCTGATGTTCC	TGCTTGGTGATGGGGGTG	63 °C/20mM
35	TCCCCCTTGGCTTGACCT	GCTGATGGACAGGCTCTCTCC	63 °C/15mM
36	CCAAATGCTCCCCACTGA	AGCCACAGTTCCCATCCAT	63 °C/10mM
37	GCTCACAGAATGTTGCTGCTA	ATCTTGTTCCCTCACTCGGA	63 °C/15mM
38	AGCCCAGGAGAACAGCCA	TGAGTGCCCCACAGTTTC	63 °C/10mM
39	TAGGGGGTGGCAGTGGTT	GGGGTCTTGGATTTAGGCATT	63 °C/15mM
40	TTATCAGGTCCATTTACAGAGG	CAGATTATAGGGTGTCTCGCC	63 °C/10mM
41	TGTGACGAGTGAGGCTTGC	CTGGATGTGGCAGAGGTC	63 °C/10mM
42	CCCTTGGCGAACCTCCTC	CAGATGGTGGCAGCAGAAAA	63 °C/10mM
43	AGACCCTGCCGACCCAC	TGCTCACTCCAAAGCCTGTG	63 °C/10mM

Exón	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	Tª hib/MgCl ₂
44	CCAATCCCCAACCTCCCA	ATCCTTCCCCTCCCACAC	63 °C/15mM
45	TCCCTCCCCTCTCATCCATC	GCCCTCAATCCAGCAGTGTG	63 °C/10mM
46	TCTTGCCCTGTCTTCCACC	TGCCCATCTTTCTCCCCACT	63 °C/15mM
47	AAAGAAAATGCTGTCAAGGCT	GAAAGGAGAAAGAAGGGGGAA	62 °C/20mM
48	GGGGACCGTCATCCTTTG	GCTCTATGTAGCCATCACCACC	62 °C/15mM
49	TGGAACAGCAAGTGAGCACA	GGCATCTGGAATCTGGCAT	62 °C/20mM
50	CTGCCTGACCACCCTCCT	CAGCCCTAGAACTCACTGATGC	63 °C/10mM
51	TTCCTTGGGGTCTTTGGG	TTTGGTGGCTGCTCAGTCTC	63 °C/20mM
52	CTCCAGAGCCCATAACAGCA	AGCCATTGTAACCCATCCAGT	63 °C/15mM
53/54	TGCCTGTCTTCTCTATCCA	AGCCAAGTTTCCCCACCTTTA	63 °C/20mM
55	GGGAGGAGAGAAGAGGGACA	GGGATTGGCTTGGGGAC	64 °C/15mM
56	TCTTTTCTCTGACTGTGCTCTTC	TGGTCTGCCTTTTTTTTTTTCA	62 °C/20mM
57/58	CACCTACAAAGTCACTGCCCA	TCAACTCTGAGCCCACCTTG	63 °C/10mM
59	ACGCTTCACCAAGGCTGAG	CCCCCAGATGACAGTCCAT	63 °C/10mM
60	GATGTGCCACCTACCCC	CTTCTCCCTCCACTGCC	63 °C/10mM
61	TGGTCCTCAGCAAACATTCA	GTGTCCCCTCCCCTACTCC	63 °C/10mM
62/63/64	AACTTTGGAGGCTTGAGGCA	GGTGAGGGAGGATGGGGT	63 °C/10mM
65	GCTGGGGACCTGGAGTG	GAGGGTGAAGGGAGGGTG	63 °C/10mM
66/67	GGGAAATGGGCAGGATGT	CTGTGTTCTCTGGAGTGGGG	63 °C/10mM
68	TAAGGGCAGGGCTCAGGAGT	CAGCAGGACAGCAAGAGACAGA	63 °C/10mM
69 (1)	GCCTGCTGCGGTAGGAGC	GTGCTTGCGGGGTGG	63 °C/10mM
69 (2)	GTAAGGAGGGTCACTGGGG	CTGAAGGTCGGCTCTGCT	63 °C/10mM

*Se utilizó touch down en este caso.

Tabla 10. Cebadores y condiciones utilizados para secuenciar todos los exones del gen *PJVK*.

Exón	Cebador directo	Cebador inverso	Temperatura hibridación/ MgCl ₂
Ex1	CTAGGCCGCAAGTCTTTGTCCTTAG	TCCCAGGCCAAACGCCATTACA	60°C/25 mM
Ex2	GCAGAGGCAGGGAATTATACAGT	ACAACTTTTGGCATTGTTAATCTT	60°C/20 mM
Ex3	TGGTGAGTCATGTTGCCTTTCT	CAACCTCAATGTTTTAAGCATTCTT	60°C/15 mM
Ex4	CTGACTATTAGGATTGCCTTGATTT	CAGCTCTTTCATCAGAACATTTC	60°C/15 mM
Ex5	TTGTTTTTGGTAGGATTATAGGAAA	GAGAGCACATGCCCTAATGAAT	60°C/25 mM
Ex6	TCATCACCCCATCAACAATAA	GAATAGAAAACCTCATGTGTTAAGC	60°C/15 mM
Ex7	GCTGTTTGCATTATGTATTTTCA	TGTGGCACAACTGCACCTAA	60°C/20 mM

En todos los casos se utilizó touch down.

3.8. Análisis de heterodúplex en DHPLC

En familias en las que el análisis de haplotipos no proporciona información útil para saber si hay o no compatibilidad de ligamiento (familias con un solo hijo afectado, por ejemplo), hemos utilizado la técnica del análisis de heterodúplex de ADN en cromatografía líquida desnaturizante de alto rendimiento o DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*). Este método se basa en la elución diferencial del ADN de diferentes tamaños, así como del ADN heterodúplex y homodúplex en una columna cromatográfica. Si un individuo es heterocigoto para una mutación en el producto de PCR que se está analizando, la desnaturalización y renaturalización lenta del producto de PCR genera heterodúplex y homodúplex de ADN. Los heterodúplex tienen la movilidad alterada en la cromatografía, de

forma que se obtiene un perfil de elución diferente en caso de individuos homocigotos (curva control, con solo homodúplex) y heterocigotos (homodúplex y heterodúplex) (Figura 14).

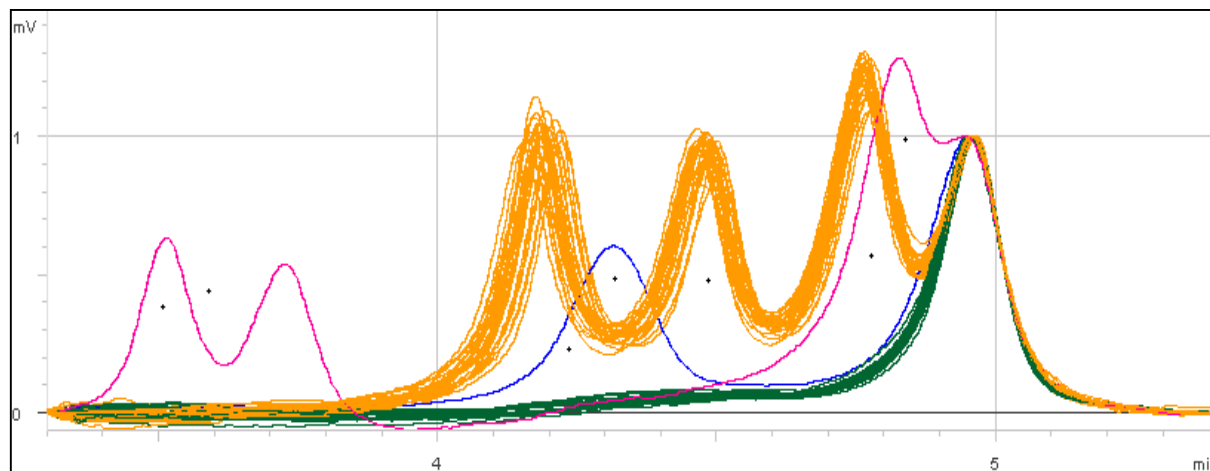


Figura 14: Ejemplo de resultados de análisis de heterodúplex en DHPLC. Se trata del análisis del exón 2 de CDH23 en 80 individuos. La curva patrón es la verde compartida por muchos individuos (cada uno representado por una línea). La curva naranja corresponde a un polimorfismo frecuente y es compartida por la mayoría de los individuos. Las curvas rosa y azul se salen de la norma. Así que de los 80 individuos analizados sólo deberemos secuenciar dos para este exón, que son los correspondientes a los perfiles azul y rosa.

Utilizando el programa *NavigatorSoftware* se eligieron las temperaturas de cromatografía idóneas para cada amplicón. Se utilizaron como controles individuos previamente secuenciados con polimorfismos en heterocigosis, para asegurar una correcta puesta a punto de la separación de heterodúplex y homodúplex en DHPLC y para la comparación de las curvas correspondientes a secuencias conocidas y a variantes no identificadas.

En esta técnica, se distinguen mejor los cambios en heterocigosis, de forma que el individuo problema podría llevar un cambio en homocigosis que pasara desapercibido. Por esta razón, incluimos en el estudio a un progenitor (normalmente la madre), en quien dicho cambio debería estar en heterocigosis. Se amplificó el ADN de la madre y del hijo (afectado), realizando una PCR por exón (conviene que los amplicones no sean mayores de 500 pb). Tras la PCR, se desnaturalizó y renaturalizó el ADN (para la formación de heterodúplex), utilizando el siguiente programa en un termociclador: 96 °C durante 6 minutos y una rampa (al 1%) que dura aproximadamente 1 hora, que fue disminuyendo dicha temperatura poco a poco hasta llegar a 40 °C, momento en el que se retiraron las muestras. La placa de tubos de PCR se tapó con una membrana de goma perforada para que el analizador *WAVE*, *Transgenomic* fuera succionando cada muestra.

Las muestras se analizaron con el programa *NavigatorSoftware*. En los casos en los que se encontraron variaciones con respecto a la curva control, se secuenció el exón correspondiente en dichos individuos por el método Sanger.

A continuación se indican las temperaturas óptimas para DHPLC utilizadas para los genes *PCDH15* (Tabla 11) y *CDH23* (Tabla 12). En algunos casos los amplicones que se habían diseñado para la secuenciación de *CDH23* eran demasiado grandes para utilizarlos en esta técnica, y por ello se diseñaron parejas de cebadores alternativas (Tabla 13).

Tabla 11. Temperaturas para DHPLC de todos los exones de *PCDH15*.

Exón	Temperatura optimizada a:
2	56,5 °C
3	56 °C
4	55,5 °C
5	57,6 °C
6	54,8 °C
7	54,6 °C
8	59,5 °C
9	55 °C
10	54,5 °C
11	55,1 °C
12	54 °C
13	55,3 °C
14	56,5 °C
15	56,8 °C
16	54 °C
17	58 °C
18	55,8 °C
19	56 °C
20	57 °C
21	55,2 °C
22	54 °C
23	58,5 °C
24	56,3 °C
25	53,8 °C
26	55 °C
27	55,4 °C
28	55 °C
29	57 °C
30	56 °C
31 y 32	57,6 °C (+1.5 SHIFT)
33 (parte A)	55,7 °C
33 (parte B)	57 °C
33c (parte C)	56 °C

Tabla 12. Temperaturas para DHPLC de todos los exones de CDH23.

Exón	Temperatura optimizada a:	Exón	Temperatura optimizada a:
2	63 °C	37	62 °C
3	60,5 °C	38	61,5 °C
4	62,5 °C	39	61,5 °C
5*	61,5 °C	40	61 °C
6*	61 °C	41	62 °C
7	63 °C	42	62 °C
8	60 °C	43	61,5 °C
9	61,5 °C	44	61 °C
10	62 °C	45	63 °C
11	60,8 °C	46	62,5 °C
12	61,4 °C	47	60,5 °C
13	61 °C	48	61 °C
14	61 °C	49* (parte 1)	61,5 °C
15	62 °C	49* (parte 2)	62 °C
16	61,8 °C	50	61,5 °C
17	60,6 °C	51	61,5 °C
18	62,7 °C	52	60,8 °C
19	62,5 °C	53*	61,5 °C
20	63 °C	54*	62 °C
21	62,2 °C	55	63,5 °C
22	62,5 °C	56	62 °C
23	61 °C	57*	63 °C
24	64 °C	58*	63 °C
25	64 °C	59	62,5 °C
26	62,6 °C	60	62,2 °C
27	63 °C	61	62 °C
28	62 °C	62/63/64* (parte 1)	63 °C
29	63,5 °C	62/63/64* (parte 2)	63 °C
30	62,5 °C	62/63/64* (parte 1)	63 °C
31	60,5 °C	62/63/64* (parte 2)	63 °C
32*	62,7 °C	65	62,8 °C
33*	63,5 °C	66/67* (parte 1)	62,8 °C
34	62,7 °C	66/67* (parte 2)	61,5 °C
35	61,8 °C	68	62 °C
36	61 °C	69 (Parte 1)*	63 °C

*Casos en los que las parejas de cebadores son distintas a las utilizadas para la secuenciación.

Tabla 13. Parejas de cebadores para DHPLC que no coinciden con las de secuenciación del gen CDH23.

	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	T ^a hibridación/ MgCl ₂
Exón 5	CCTCCCGCCCCATTTAG	GCCGCCACCTGACTCTG	63 °C/10mM
Exón 6	CACAGGATTTCTGGACCCC	CCCAACTGCTCTTCCCAAC	62 °C/20mM
Exón 32	TGGAAAAGTGGGCAGAATGA	GCGAGGACATGGGTTAGGA	62 °C/20mM
Exón 33	AGTGGGGTCTGGAAGAGCC	TGGGAGAGGTGGGAAGGTC	62 °C/10mM
Exón 49 (parte 1)	TGGAACAGCAAGTGAGCACA	TAGGTGACCAGCCCATTAAAGG	63 °C/20mM
Exón 49 (parte 2)	CTTTGGGATCACCTACTACATGGA	GGCATCTGGAATCTGGCAT	62 °C/20mM
Exón 53	TGCCTGTCCTTCCTCTATCCA	AGACATCCTTCCCACGCTTC	62 °C/15mM
Exón 54	AAGGATGTCTCAACCAGAGCTACT C	AGCCAAGTTTCCCCACCTTTA	62 °C/15mM
Exón 57	CACCTACAAAGTCACTGCCCA	AAGTCTCTCTTCGTTGCCG	63 °C/20mM
Exón 58	GCTAGTGCCCTGATTACCCTG	TCAACTCTGAGCCCACCTTG	63 °C/15mM
Exones 62-64 (parte 1)	AACCTTTGGAGGCTTGAGGCA	GTGGGGGACACTCACACAGTC	63 °C/15mM
Exones 62-64 (parte 2)	CCGCCATGCTCTTTGTCC	GGTGAGGGAGGATGGGGT	64 °C/15mM
Exones 66/67 (parte 1)	GGGAAATGGGCAGGATGT	CTGGCTCACATGGGTGC	62 °C/15mM

	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	T ^a hibridación/ MgCl ₂
Exones 66/ 67 (parte 2)	TGAGTGAGATCGCCGACC	CTGTGTTCTCTGGAGTGGGG	63 °C/15mM
Exón 69 (parte codificante)	GCCTGCTGCGGTAGGAGC	GGACGGTGGATGGGTGCT	65 °C/15mM

3.9. Predicción in silico de la patogenicidad de las mutaciones encontradas

En primer lugar se comprobó la frecuencia poblacional de los cambios identificados, si la frecuencia es alta no pueden ser considerados patogénicos ya que la hipoacusia monogénica es considerada una enfermedad rara. En general, la MAF (*Minor Allele Frequency* o frecuencia del alelo minoritario) debe ser menor a 0,01 (1%). Para conocer las frecuencias poblacionales se utilizaron las bases de datos *1000Genomes Project* y *NHLBI-ESP* (*Exome Sequencing Project*).

Para predecir la patogenicidad de las mutaciones tipo *missense* se usaron los programas:

- *Polyphen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) [Adzhubei et al., 2010]. Asigna valores que van de 0 a 1, siendo 0 la mutación más benigna y 1 la mutación más patogénica.
- *SIFT* (<http://sift.jcvi.org/>) [Ng PC and Henikoff, 2003] asigna valores que van de 0 a 1, siendo 0 la mutación más patogénica y 1 la más benigna (justo al revés que *Polyphen*). Considera patogénicas las mutaciones con un valor menor a 0,05.

Estos dos programas se basan en las características de la secuencia (si afecta a algún dominio funcional), en la conservación de los aminoácidos y en la posible afectación de la estructura 3D de la proteína.

- *Conseq* (<http://conseq.tau.ac.il/>) o *Consurf* (<http://consurf.tau.ac.il/>) se utilizan para ver el grado de conservación evolutiva de los aminoácidos afectados por las mutaciones. Valora la conservación de cada aminoácido, asignando valores que van de 1 a 9 (de menor a mayor conservación). Este programa también indica si el aminoácido se encuentra expuesto o hacia el interior en la estructura 3D de la proteína [Berezin et al., 2004] [Celniker et al., 2013].

Para valorar la posible patogenicidad de cambios que puedan afectar al *splicing* se utilizaron los programas:

- *MaxEntScan* (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html) [Yeo and Burge, 2003]
- *Splice site prediction by neural network (SSPNN)* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) [Adams et al., 2000].

MaxEntScan valora la funcionalidad de pequeñas secuencias (6 pb para el sitio 5' donador y 23 pb para el 3' aceptor) que contienen un único sitio de *splicing*. Se basa en el principio de máxima entropía y engloba varios modelos probabilísticos de motivos de secuencia como MAXENT (*Maximum Entropy*), MDD (*Multiple Dependence Decomposition*), NM (*first order Markow Model*) y WNM (*Weight Matrix Model*). Los valores que asigna en cada modelo son siempre más altos en sitios de *splicing* mejores.

SSPNN, en cambio, identifica todos los posibles sitios de *splicing* presentes en una secuencia.

Para predecir la existencia de elementos ESE (*Exonic Splicing Enhancer*) se utilizaron dos programas: ESEfinder 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE>) que predice la presencia de elementos ESE basándose en los motivos de unión de varias proteínas SR (*Serin S*, *Aginin R* *rich proteins*) (SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55) que reconocen este tipo de elementos [Cartegni et al., 2003; Smith PJ et al., 2006]; y RESCUE-ESE (<http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese>) identifica secuencias de hexámeros que se encuentran con mayor frecuencia en exones que en intrones y sobre todo en exones con sitios de *splicing* débiles [Fairbrother et al., 2002].

3.10. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

La técnica de MLPA (múltiple amplificación de sonda dependiente de ligación) permite detectar CNVs (*Copy Number Variations*), es decir, grandes deleciones o inserciones que pueden afectar a uno o varios exones y que no serían detectables por secuenciación Sanger. La técnica de MLPA se basa en las reacciones de hibridación, ligación y amplificación de sondas específicas (Figura 15).

Cada pareja de sondas LPO (*left probe oligo*) y RPO (*right probe oligo*), necesaria para cada exón o parte de éste, son dos oligonucleótidos que, si consiguen hibridar sobre el ADN previamente desnaturalizado, quedan a poca distancia y se pueden unir por medio de una ligasa. Si esto ocurre, en el paso de PCR se van a amplificar exponencialmente. En la PCR se utiliza un único par de cebadores para todas las sondas, ya que éstas tienen en sus extremos secuencias de reconocimiento idénticas.

Cada pareja de sondas genera un amplicón de PCR con longitud única que es identificada y cuantificada por electroforesis capilar. De esta forma se sabe a que secuencia corresponde cada fragmento. Las diferencias entre muestras de ADN se detectan por comparación de los patrones obtenidos en las muestras de referencia (Figura 15-B).

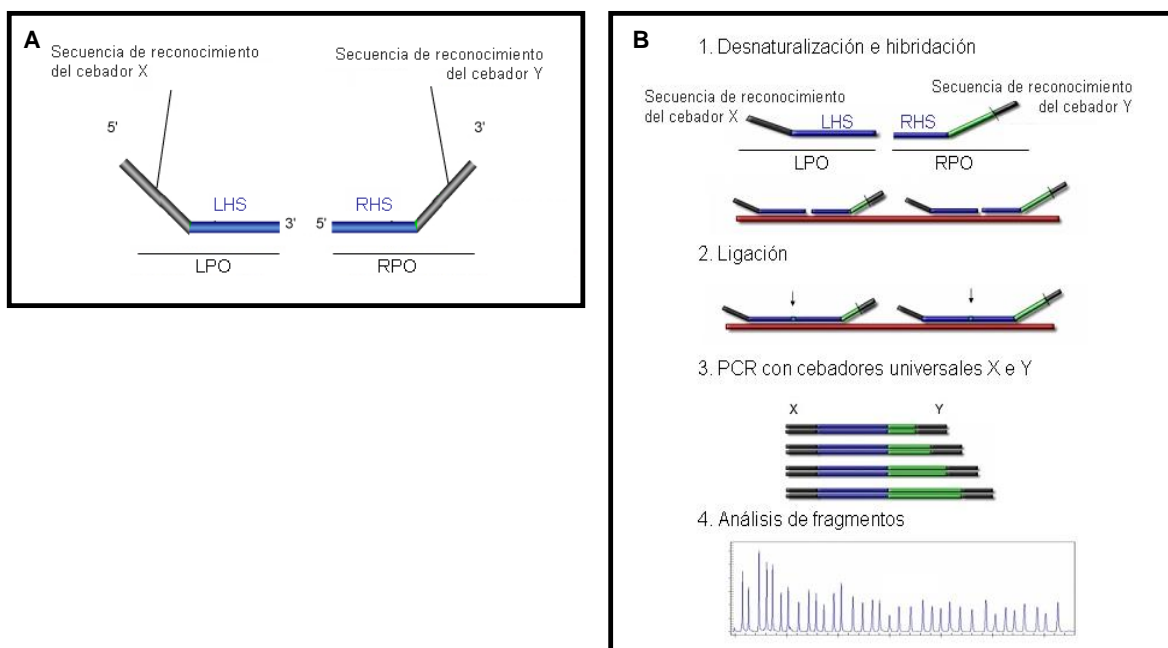


Figura 15. A: Estructura de las sondas de MLPA. B: Representación esquemática de los pasos de un ensayo de MLPA (adaptada de MRC Holland).

Se utilizó esta técnica en los individuos con una sola mutación en heterocigosis en el gen *PCDH15*. Para ello se empleó el *kit* comercial *SALSA MLPA P292 PCDH15 probemix* de *MRC-Holland MLPA*, y se siguió el protocolo del fabricante a la mitad de volumen.

Para llevar a cabo esta metodología hay que disponer de ADNs de alta calidad, con el fin de evitar falsos positivos.

3.11. Ensayos funcionales con minigenes (gen *MYO7A*)

Cuando los tejidos de interés no son accesibles, como en nuestro caso la cóclea, las aproximaciones con minigenes son una herramienta muy útil para comprobar los efectos de mutaciones que puedan afectar al *splicing*.

3.11.1. Preparación de las construcciones

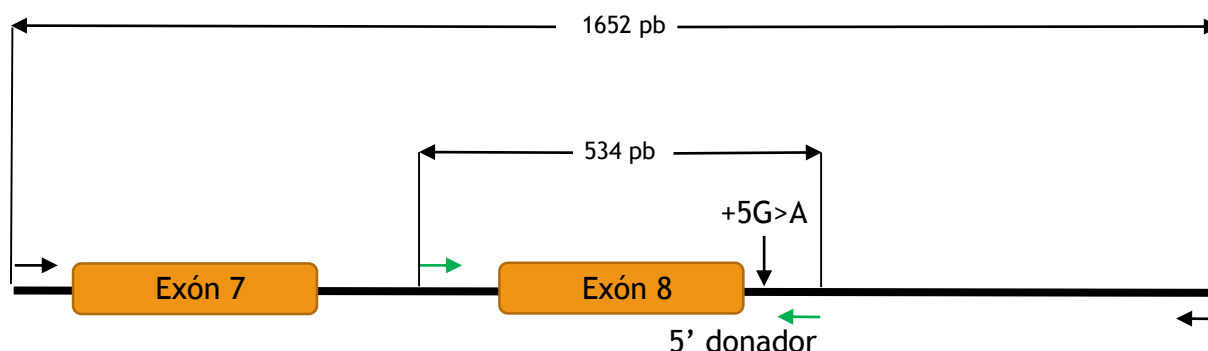
Se amplificaron en el paciente (heterocigoto para el cambio a estudiar) un fragmento de 534 pb que incluía el exón 8 del gen *MYO7A* y una pequeña parte de los intrones flanqueantes; y otro de 1.652 pb que abarcaba desde el intrón 6 hasta el final del intrón 8 del gen *MYO7A* (Tabla 14 y Figura 16).

A los cebadores utilizados para la amplificación de estos fragmentos se les ha añadido una cola que incluía la diana de la enzima de restricción y un poco más de secuencia aleatoria necesaria para el reconocimiento y corte de las endonucleasas.

Tabla 14. Cebadores empleados para la amplificación del fragmento de interés

Fragmento	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')
534 pb	CACACA CTCGAG CCGTATTGCTGCCC GTATTGC	CACACA GGATCC AAGCCAGCCTGCCGT GTG
1.652 pb	CACACA CTCGAG CAGGCAGTGGGGC GGGAGC	CACACA GGATCC TGGGGCAGGGCGAGT GTGG

En rojo, la secuencia diana de la enzima de restricción *XhoI*. En verde, la secuencia diana de la enzima de restricción *BamHI*. En azul la secuencia extra añadida.

**Figura 16.** Representación de los amplicones utilizados para amplificar en el paciente la región de interés de MYO7A.

Tras la comprobación en gel se purificaron los productos de la PCR con el *kit* comercial *Nucleospin* (protocolo de purificado de producto de PCR). Los productos de la PCR purificados se digirieron con *BamHI*, y se cargaron en un gel de agarosa *Seakem* GTG al 0,8 %. Se cortó la banda correspondiente al producto amplificado y se extrajo el ADN con el *kit* *Nucleospin* (protocolo de extracción de banda). A continuación se digirió con la enzima *XhoI* y se volvió a purificar con el *kit* *Nucleospin* (protocolo de purificado de producto de PCR). Se obtuvieron 15 µL de inserto digerido a 21,5 ng/µL.

Decidimos emplear el vector de clonaje pSLP3 (Figura 17). Este vector incluye el gen de resistencia a Ampicilina, un segmento de SV40 para la replicación y transcripción en células eucariotas, señales de splicing HIV-1 *tat* y un sitio de policlonaje. El segmento *tat* contiene un intrón, un sitio 5' donador, otro 3' aceptor y dos exones flanqueantes (Figura 18). El vector se digirió con las mismas enzimas para integrar nuestro producto de PCR digerido en el sitio de policlonaje flanqueado por los exones del vector (Figura 18).

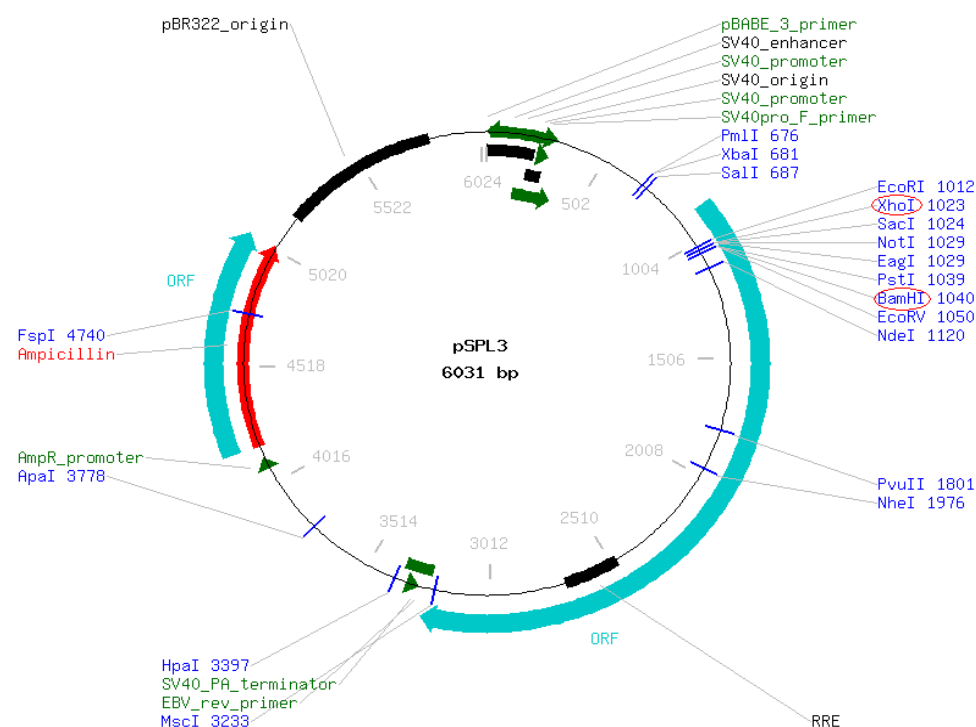


Figura 17. Estructura del plásmido pSLP3. Se han destacado los sitios de corte de las enzimas *XhoI* y *BamHI*.

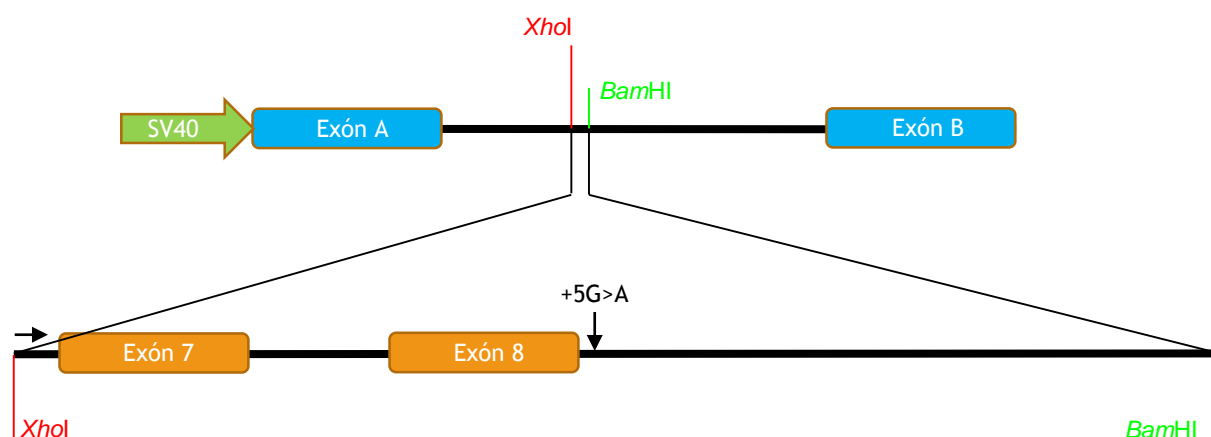


Figura 18. Esquema de la región del plásmido donde se va a integrar de forma direccional nuestro amplificado de PCR digerido.

Se digirieron 5 µg de plásmido con la enzima *BamHI* y se comprobó en un gel de agarosa que el plásmido había sido digerido por completo. Se cargó todo el volumen en un gel de agarosa *Seakem GTG* al 0,8%, se cortó la banda y se purificó el ADN con el kit *Nucleospin*. Luego se digirió todo el volumen con *XhoI*, se inactivó la enzima por incubación a 65 °C durante 20 minutos y se purificó de nuevo con *Nucleospin*, obteniendo 30 µL de vector digerido a 38 ng/µL.

Se realizó la ligación de los dos fragmentos en una proporción 1:5 (vector:inserto).

Las cantidades fueron las siguientes:

Reactivo	Volumen
pSLP3 digerido con <i>Bam</i> HI y <i>Xho</i> I (19 ng totales)	0,5 µL
Inserto (<i>MYO7A</i> Ex7-8-9) digerido con <i>Bam</i> HI y <i>Xho</i> I (95 ng totales)	3,8 µL
Tampón 10X de Ligasa T4 (<i>Roche</i>)	1 µL
Ligasa T4 4U/µL (<i>Roche</i>)	1 µL
H ₂ O destilada inyectable	3,7 µL
Volumen total	10 µL

Se incubó a 16°C durante 5 horas.

Además se incluyó un control negativo (al que no añadimos inserto), para deducir qué proporción de plásmido había recircularizado sin incluir el inserto. Y un control positivo, el marcador de peso molecular II, para ver si había funcionado la reacción de ligación.

3.11.2. Transformación

Utilizamos células competentes de la estirpe comercial *XL1-blue* (*Agilent*). Se prepararon 3 tubos *ependorf* con 50 µL de células competentes cada uno y se pusieron en hielo. Se añadió a cada tubo 0,85 µL de β-mercaptoetanol y se mantuvieron 10 minutos en hielo. Después se añadieron a un tubo 3 µL de la ligación de vector más inserto; a otro, 3 µL de ligación de sólo vector; y al último, 0,5 µL del vector original. Se mantuvieron otros 30 minutos en hielo. A continuación se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y se volvieron a poner los tubos en hielo. A cada tubo se le añadieron 450 µL de medio SOC, se pasó todo el volumen a un tubo de 13 mL y se incubó en la estufa a 37 °C con agitación (200 rpm) durante 1 hora. Después se extendieron 200 µL del cultivo en placas de LB-ampicilina y se incubaron en la estufa a 37 °C toda la noche.

Se seleccionaron 16 colonias de la placa de vector más inserto, se prepararon cultivos líquidos en 3 mL de LB/ampicilina que se incubaron en el baño a 37 °C con agitación durante 16 horas. El ADN de las colonias se extrajo con el *kit QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*), y se midió su concentración en el espectrofotómetro *Nanodrop 1000*. La detección de colonias que llevasen el vector con inserto se hizo mediante PCR con cebadores del vector. Se secuenciaron ADNs de 8 colonias con inserto para comprobar que la polimerasa no hubiera introducido más cambios y para determinar cuáles eran los plásmidos silvestres y los mutantes.

Dado que el paciente llevaba en un alelo la mutación y en el otro un polimorfismo frecuente, realizamos una mutagénesis dirigida para eliminar el polimorfismo, con el fin de conseguir una total isogenicidad.

3.11.3. Mutagénesis dirigida

El polimorfismo del alelo silvestre se eliminó mediante mutagénesis dirigida. Se diseñaron los cebadores con ayuda de la herramienta *Primer Design* (Agilent) http://staging.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp?&_requestid=716. Se preparó la mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
<i>Pfu Turbo buffer</i> 10x (Agilent)	5 µL
dNTPs (1,25 mM cada uno)	8 µL
Cebador de mutagénesis directo 10 µM	1 µL
Cebador de mutagénesis inverso 10 µM	1 µL
Enzima <i>Pfu Turbo DNA polymerase</i> (2.5 U/ µl) (Agilent)	1 µL
H ₂ O	33,5 µL
ADN minigén (50 ng/µL)	0,5 µL (25 ng totales)

Y se utilizó el siguiente programa:

	95 °C	30 segundos (activación de la enzima)
18 ciclos	95 °C	30 segundos (desnaturalización)
	55 °C	30 segundos (hibridación)
	68 °C	5 minutos (extensión, tiempo proporcional a kb amplificadas)
	68 °C	10 minutos (extensión final)
	12 °C	Conservación de muestras hasta la retirada del aparato

Después se digirió con la enzima *DpnI* para eliminar el ADN genómico sobrante.

Tras la mutagénesis dirigida se volvieron a transformar las células competentes con la nueva construcción, siguiendo los mismos pasos ya detallados. Tras la selección de colonias, el cultivo líquido y la purificación del ADN, se secuenciaron 8 colonias y se seleccionaron las que contenían el inserto silvestre sin el polimorfismo y no tenían ningún cambio introducido por las polimerasas.

3.11.4. Transfección

Con los minigenes silvestre y mutante se transfectaron células HeLa. Para ello se utilizó medio completo (preparado con 45 ml *DMEM*, 4,5 µL de suero bovino fetal y 450 µL de mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina a 100 U/µL cada uno). Se cultivaron las células en placas *Petri* con 7 mL de medio. Cuando la ocupación de la placa se encontraba entre el 80 y el 90 % se eliminó el medio, se lavó la placa con tampón PBS, y se añadieron 2 mL de tripsina y se incubó a 37°C durante 1 minuto. Después se añadieron 4 mL de medio y se centrifugó (en un tubo *falcon* de 15 mL) a 1.400 rpm durante 5 minutos. Se aspiró el medio con una bomba de vacío, quedando en el fondo un precipitado (o *pellet*) donde se encuentran las células; a este precipitado se le añadieron 2 mL de medio completo, se homogeneizó la muestra y se recogieron 10 µl para el conteo de las células. Se calculó el número de células por microlitro y se añadieron unas 250.000 células/pocillo en 2 pocillos de una placa de 6 pocillos, en un volumen final de 2 mL (completado con medio completo) y se incubó en la estufa a 37 °C durante toda noche.

Al día siguiente se prepararon 4 tubos *ependorf* con 250 µL de *OPTIMEM-Glutamax* cada uno (atemperado a 37 °C); a dos de los tubos se les añadieron 10 µL de Lipofectamina 2000, al tercero se le añadieron 500 ng del minigén silvestre y al último 500 ng del minigén mutante; se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se recogió todo el volumen (~250 µL) de los tubos donde habíamos añadido los minigenes y se pasó cada uno de ellos a un tubo de los que contenían la lipofectamina. La mezcla se incubó 20 minutos a temperatura ambiente.

En los 2 pocillos de la placa preparada el día anterior (con una ocupación del 80-90%) se eliminó el medio, se lavó con PBS y se añadieron 2 mL de medio completo sin antibióticos. Con una pipeta *pasteur* gota a gota se añadió a cada pocillo la mezcla (minigén, lipofectamina y *OPTIMEM-Glutamax*) silvestre y mutante incubándolo en la estufa a 37 °C durante 6 horas. Pasado ese tiempo se retiró el medio sin antibiótico, se añadieron 2 mL de medio completo y se incubó en la estufa a 37°C durante toda la noche.

3.11.5. Extracción de ARN

Al día siguiente tras comprobar la supervivencia celular en el microscopio, se procedió a la extracción del ARN. Para ello, se retiró el medio de la placa, se lavó con PBS, y se añadió 1 mL de TRIZOL a cada pocillo, incubándolo 1 minuto a temperatura ambiente. Utilizando una espátula (*scraper*) y una pipeta P1000 se recogió todo el volumen de cada uno de los dos pocillos y se transfirió a dos tubos *ependorf*. Se añadieron a cada tubo 200 µL de cloroformo y se vortexeó hasta homogeneizar las muestras; se incubó 3 minutos a

temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g y 4°C durante 15 minutos. Se forman 3 fases (la inferior rosada, la intermedia estrecha y la superior acuosa). Se recogió la fase acuosa de ambos tubos con una pipeta P1000 y se transfirió a dos tubos *ependorf* nuevos. Se añadieron 500 µL de isopropanol a cada tubo, se vortexeó e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se centrifugó a 12.000 g y 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante. Después se añadió 1 mL de etanol al 75 % a cada tubo, se vortexearon hasta levantar el precipitado y se volvieron a centrifugar a 7.500 g y 4°C durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado en las proximidades de una llama. El color inicial es blanquecino, pero el secado lo vuelve transparente. Se resuspendió cada muestra en 50 µL de agua destilada libre de RNasas y se incubaron 10 minutos a 65 °C. A continuación se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro (*Nanodrop 1000*). Se suele obtener una concentración de 400 ng/µL.

3.11.6. Retrotranscripción

Se realizó con la enzima *AMV reverse* y *random primers*. Los *random primers* son cebadores de secuencia aleatoria y corta (6 pb) que se unen a todos los ARNs presentes, permitiendo la retrotranscripción del ARN total. En primer lugar se preparó una dilución de 500 ng de ARN en un volumen de 8,2 µL y se incubó a 65 °C durante 10 minutos.

La mezcla de reacción para cada minigén a estudiar es la siguiente:

Reactivo	Volumen
Tampón <i>AMV reverse</i> 10X (<i>Promega</i>)	2 µL
MgCl ₂ (25 mM) (<i>Promega</i>)	4 µL
dNTPs (1,25 mM cada uno) (<i>Promega</i>)	2 µL
<i>Random primers</i> 10 µM (<i>Promega</i>)	2 µL
Inhibidor de RNasas 40 U/ µL (<i>Promega</i>)	1 µL
Enzima <i>AMV reverse</i> 10 U/ µL (<i>Promega</i>)	0,8 µL
ARN extraído diluido (500 ng totales)	8,2 µL

Se programó en un termociclador: 25 °C 10 minutos, 42 °C 59 minutos, 99 °C 5 minutos. Los ADNc se conservan a -20 °C.

3.11.7. PCR

Una vez obtenidos los ADNc se amplificaron con la pareja de cebadores:

- SD: (5'-TCTGAGTCACCTGGACAACC-3') sin marcar o con marcaje FAM en 5'.
- SA: (5'-ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC-3') sin marcar

Estos cebadores se localizan en los exones del plásmido pSPL3 y sirven para comprobar si en los ADNc de interés se ha producido un *splicing* normal o no. Se hizo una PCR a 28 ciclos para la cuantificación, utilizando el cebador SD marcado; y otra a 35 ciclos para la secuenciación, con los cebadores sin marcar. En dicha PCR la hibridación se realizó a 58 °C y se programaron 45 segundos de extensión. Los productos de PCR se comprobaron en un gel de agarosa al 1,5 %. Por una parte, el producto a 35 ciclos se secuenció por el método Sanger (fue necesario clonarlo, ya que había varias bandas). Por otra parte, los amplificados a 28 ciclos se analizaron en el genotipador con el fin de cuantificar los distintos productos. Para ello, se utilizó 1 µL de la PCR para cada muestra, 0,2 µL de ROX y 12 µL de formamida, se separaron los fragmentos por electroforesis capilar (*ABI3100 Applied Biosystems*) y se cuantificó por análisis del área de pico la proporción de los diferentes fragmentos.

3.12. Detección de transcritos de los genes implicados en HNSAR en tejidos de fácil muestreo

3.12.1. Detección de transcritos por RT-PCR

Extrajimos ARN total de sangre, saliva y orina en 5 individuos controles sanos (3 mujeres y 2 varones), y realizamos la retrotranscripción (RT) con la enzima *Superscript II* y *random primers* (véase apartado 3.5). Para la RT se utilizaron en todos los casos 300 ng de ARN total.

Se diseñaron cebadores para amplificar una región del ADNc de cada uno de los genes de interés (donde se incluyen genes relacionados con HNSAR y/o síndrome de Usher, Tabla 15). Para el diseño se tuvo en cuenta que en el sitio de localización de los cebadores no hubiera polimorfismos descritos y que no fuera posible la amplificación de ADN genómico (distancia de los cebadores en ADN genómico de más de 2 kb). Si el gen codificaba varias isoformas con distintos exones, los cebadores se colocaron en exones comunes para todas las isoformas. Se cuidó también que el amplicón no fuera demasiado grande (nunca más de 1000 pb). Y las PCRs se hicieron siempre a 40 ciclos, con MgCl₂ a 15 mM, pero con la temperatura y tiempo de extensión óptimo para cada fragmento.

Tabla 15. Cebadores diseñados hasta la fecha.

Gen	Localización cebadores	Secuencia de cebadores utilizados	Temp	Tamaño del amplicón ADNc/ADNg
<i>CDH23</i>	Exón 1 y 3/4	GATCCGGCGGAGAGCAGA AAGAACCCACAGGCGTGTCTCT	64°C	219 pb/50 kb
<i>CLRN1</i>	Exón 2 y 4	AAAGCAATCCCAGTGAGCA GCCCATTCAGAAAATGAACAA	57°C	379pb/13,7 kb
<i>COL11A2</i>	Exón 1 y 4	CCTCAGGGCATCCAGCGT GGCACCAGAGATGATCACTCCA	65°C	645 pb/3,9 kb
<i>ESPN</i>	Exón 1 y 3	GCAGGGCGAGCTGGACGTG GGCGTGCAGCGGGGTCAT	68°C	604 pb/15,4 kb
<i>GJB6</i>	Exón 4 y 5	GACATTCGTATCATCACTGTGC AAGATGACTGTGATCCACACCT	59°C	242 pb/6,4 kb
<i>GPR98</i>	Exón 84 y 86	ACATTACCTGTATCTTTGCCA GTCCTTCCTCTGAAGACATC	56°C	371 pb/107 kb
<i>LOXHD1</i>	Exón 23 y 25	AATGCGGGCACAGATGCTAAT CGTCATGCACTTCCCAAGAGAT	61°C	255 pb/3,5 kb
<i>MYO3A</i>	Exón 5 y 8	ATTGCCTATATTTTACATGAAGC GGGATGAAGGTCAGCTAGT	56°C	327 pb/25 kb
<i>MYO6</i>	Exón 3 y 6	CTCTCATAAACCAAGTGT TTCTCCAGATACAATGAT	51°C	329 pb/10 kb
<i>MYO7A</i>	Exón 7 y 10	AATGACAACCTCAAGCCGTTTC CAGGTTTTCAAATGTGCGTG	61°C	405 pb/2,4 kb
<i>MYO15A</i>	Exón 2 y 5	CCAAGCCAAGAGCCTGTAGTCT TGGTATGGGTTACCGACAC	63°C	364 pb/4 kb
<i>OTOA</i>	Exón 22 y 24	GAAGGAGAAAGCAATACAG CTACCAAATGAAAGCTCTT	56°C	251 pb/12,1 kb
<i>OTOF</i>	Exón 33 y 36	TACTTTGCCTCCATTGACACC GCAGCCAGTCCTCAAAGTTATC	60°C	286 pb/3,4 kb
<i>PCDH15</i>	Exón 19 y 20	AGGGACTACTATGAACTTGTT TACTTGCTTCTTGGTCTG	54°C	331 pb/2,6 kb
<i>PJK</i>	Exón 2 y 5	AAATATCAACCTCTAAGTCTGGT CTGTTTCATCCATAAAGTGAAA	54°C	483 pb/5 kb
<i>SANS</i>	Exón 1 y 2	GCCATGAACGACCACTAC GCTTCTTCTGCATCTTGG	62°C	661 pb/2,9 kb
<i>SLC26A4</i>	Exón 3 y 5	TTGTTCAAGAAAGAGAGCCTT AGATCCCACCATTAACTCAC	57°C	286 pb/11 kb

Gen	Localización cebadores	Secuencia de cebadores utilizados	Temp	Tamaño del amplicón ADNc/ADNg
<i>SLC26A5</i>	Exón 5 y 7	TTCATTTTACCCTGTTATCA CCACAAATCCAAACCTAC	54°C	260 pb/2,5 kb
<i>TECTA</i>	Exón 8 y 10	GAGTTCTCCTACACCCTCCT TCATCACACTGACATCCCT	60°C	863 pb/9,3 kb
<i>TMC1</i>	Exón 16 y 18	CCTCTCATCGCTTTGAAATGG AAAACATGCCCTTAGAAAGTCCC	58°C	345 pb/13,1 kb
<i>TRIOBP</i>	Exón 4 y 6	ATGTCCACCTGCCCCTGA GCCCTTTGGGAGCTGTCA	65°C	405 pb/2,5 kb
<i>USH1C</i>	Exón 9 y 12	CCAGAAGCCTGGCATCTTTAT CCTGGAGGATCTTGTTGGACT	62°C	305 pb/1,7 kb
<i>USH2A</i>	Exón 2 y 4	GCTGTATGGCTGAAACCTGAGCAAC TTGCATTGAAAGGTGTATGATCCTTCTC	58°C	268 pb/56 kb
<i>WHRN</i>	Exón 1 y 3	TGCGGTTACTGTCTGCCAAC TGCCTTCTGCTTCAGAGCCT	65°C	858 pb/38,4 kb

3.12.2. *ARNseq*

En dos de los individuos controles del apartado anterior, un varón y una mujer, extrajimos mayor cantidad de ARN de los tres tejidos: sangre, orina y saliva para hacer secuenciación masiva de ARN (*ARNseq*). En las 2 muestras de sangre realizamos un protocolo de desglobinización para eliminar los ARNs de globinas (que están demasiado representados y enmascarían los resultados que nos interesan) con el *kit GLOBINclear* (*Ambion*), siguiendo las indicaciones del fabricante. Comprobamos la integridad y calidad de los ARNs con la plataforma *High Sensitivity RNA Screen Tape* (*Agilent*) y medimos su concentración con el fluorómetro *Qubit*. Se secuenciaron unos 5 µg de ARN de cada tejido.

3.13. Secuenciación de paneles de genes de hipoacusia

Hemos utilizado el panel de *Genycell OTO-NGS-Panel* (desarrollado y validado en nuestro servicio) para la secuenciación de un gran número de genes de hipoacusia en individuos en los que previamente se habían descartado únicamente mutaciones en el locus *DFNB1* (*GJB2* y *GJB6*).

Tabla 16. Genes que se incluyen en el panel de genes de hipoacusia OTO-NGS-Panel.

ACTG1	EYA4	MSRB3	RDX
BSND	GIPC3	MYH14	SERPINB6
CABP2	GJB2	MYH9	SLC17A8
CCDC50	GJB3	MYO15A	SLC26A4
CDH23	GJB6	MYO1A	SLC26A5
CEACAM16	GPSM2	MYO3A	SMPX
CIB2	GRHL2	MYO6	TECTA
CLDN14	GRXCR1	MYO7A	TJP2
COCH	HGF	OTOA	TMC1
COL11A2	ILDR1	OTOF	TMIE
CRYM	KCNQ4	OTOG	TMPRSS3
DFNA5	LHFPL5	OTOGL	TPRN
DFNB31	LOXHD1	P2RX2	TRIOBP
DFNB59	LRTOMT	PCDH15	TSPEAR
DIABLO	MARVELD2	POU3F4	USH1C
DIAPH1	MIR182	POU4F3	USH2A
ESPN	MIR183	PRPS1	WFS1
ESRRB	MIR96	PTPRQ	

Este panel contiene 71 genes causantes de hipoacusia síndrónica y no síndrónica (Tabla 16). Incluye genes de hipoacusias de herencia AD, AR y ligada al X. Se ha diseñado utilizando la herramienta *Suredesign* (Agilent) basado en el sistema de captura *HaploPlex* (Agilent). La secuenciación se realizó en la plataforma *MiSeq* (Illumina). Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el alineador *BWA* versión 0.6.1. Para el filtrado utilizaron *Picard-tools* (<http://picard.sourceforge.net/>) y *SAM tools* versión 01.18 [Li et al., 2009]. Los archivos *Variant Calling Files* (VCFs) fueron generados con la ayuda de *GATK* (<http://dx.doi.org/10.1101/gr.107524.110>). Los resultados (VCFs) los analizamos y filtramos utilizando *Ingenuity* (<http://www.ingenuity.com/>).

3.14. Secuenciación de exoma completo Whole Exome Sequencing (WES)

Los proveedores de secuenciación masiva solicitan que se les envíen al menos 5 µg de ADN de buena calidad a una concentración mínima de 25 ng/µL, solemos enviar 150 µL a 50 ng/µL, junto con las mediciones de calidad y la foto de los ADNs en un gel de agarosa al 0,8%.

Para el WES se utilizó la captura con *Agilent SureSelect Target Enrichment System* para 51 Mb y se ha realizado en la plataforma de secuenciación masiva *Illumina HiSeq2000*. El alineamiento frente al genoma de referencia GRCh37/hg19 se realizó con

el software *BWA*. Para el filtrado utilizaron *Picard-tools* (<http://picard.sourceforge.net/>) y *SAMtools* [Li et al., 2009]. Los archivos *Variant Calling Files* (VCFs) fueron generados con la ayuda de dos algoritmos *VarScan* (<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp373>) y *GATK* (<http://dx.doi.org/10.1101/gr.107524.110>). Los resultados (VCFs) los analizamos y filtramos utilizando *Ingenuity* (<http://www.ingenuity.com/>). Además utilizamos el visor IGV (*Integrative Genomics Viewer*, [Robinson et al., 2011] y [Thorvaldsdóttir et al., 2013]) para examinar visualmente las variantes, con el fin de descartar posibles artefactos.

4. RESULTADOS

4.1. Gen *MYO7A* (DFNB2)

Estudiamos las 77 familias españolas con HNSAR en las que se habían excluido mutaciones en el locus DFNB1. Las genotipamos para marcadores microsatélite próximos al gen (véase apartado 3.6, Tabla 2) y se realizó el análisis de haplotipos. En 14 familias no se pudo excluir el ligamiento gen-enfermedad (había compatibilidad de ligamiento o no eran informativas). En un individuo afecto de cada una de ellas se secuenciaron todos los exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *MYO7A*. Se identificaron mutaciones potencialmente patogénicas en dos familias (Tabla 17).

Tabla 17. Mutaciones identificadas en el gen *MYO7A*.

Familia	Mutación	Tipo	Estado	SIFT	Polyphen	Conseq
S202	c.3490C>T/p.R1164W	Missense	Heterocigosis	0	1	8
	c.5510T>A/p.L1837H	Missense	Heterocigosis	0	0.947	7
S1157	c.849+5G>A	Splicing	Heterocigosis	-	-	-
	c.3719G>A/p.R1240Q ⁽¹⁾	Missense	Heterocigosis	0	1	9

Números de acceso NM_000260.3, NP_000251.3. ⁽¹⁾[Janecke et al., 1999].

En la familia S202 hemos identificado dos mutaciones *missense* que no habían sido previamente descritas. La mutación p.R1164W afecta al primer dominio MyTH4 y la p.L1837H al segundo dominio MyTH4 (véase apartado 1.5.1, Figura 9). Las mutaciones segregan con la hipoacusia en la familia (Figura 19), afectan a residuos conservados dentro de los dominios funcionales MyTH4 y los programas informáticos las consideran claramente patogénicas (Tabla 17). Estos individuos habían recibido un diagnóstico de HNSAR a las edades de 18 y 19 años, respectivamente. Al identificar las mutaciones en el gen *MYO7A* se volvió a contactar con la familia por si habían aparecido otros signos clínicos. Pudimos comprobar que los dos afectados de la familia habían desarrollado Retinitis Pigmentaria (RP). Por lo tanto se trataba de un caso de síndrome de Usher causado por mutaciones en *MYO7A*.

En la familia S1157, de etnia gitana, identificamos la mutación p.R1240Q, que ya había sido descrita como causante de síndrome de Usher [Janecke et al. 1999]. En este caso, la mutación p.R1240Q iba acompañada por el cambio c.849+5G>A, no descrito, que podía afectar al *splicing* (Figura 20). Para valorar la patogenicidad de la variante c.849+5G>A realizamos en primer lugar un análisis informático con el programa *MaxentScan*. El programa valora la funcionalidad de pequeñas secuencias, 6 pb para el sitio 5'. Engloba varios modelos probabilísticos MAXENT, MDD, NM y WNM, cuyos valores serán más altos en los sitios de *splicing* mejores (Figura 21). La disminución en los cuatro índices sugería que la mutación podía realmente afectar al *splicing*.

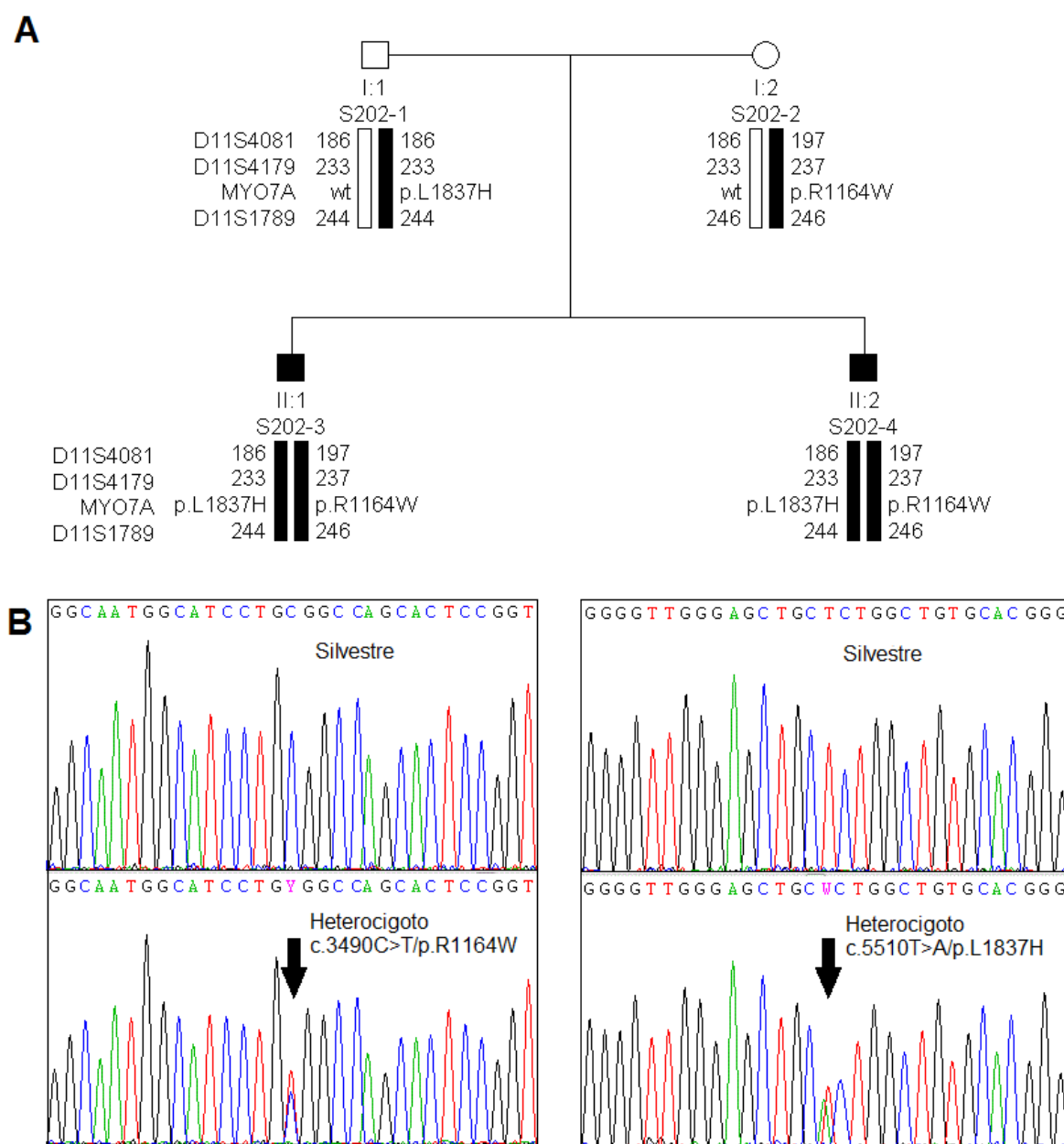


Figura 19. A. Análisis de haplotipos en la familia S202 y segregación de las mutaciones. **B.** Electroferogramas de las mutaciones identificadas en el gen MYO7A, en la familia S202.

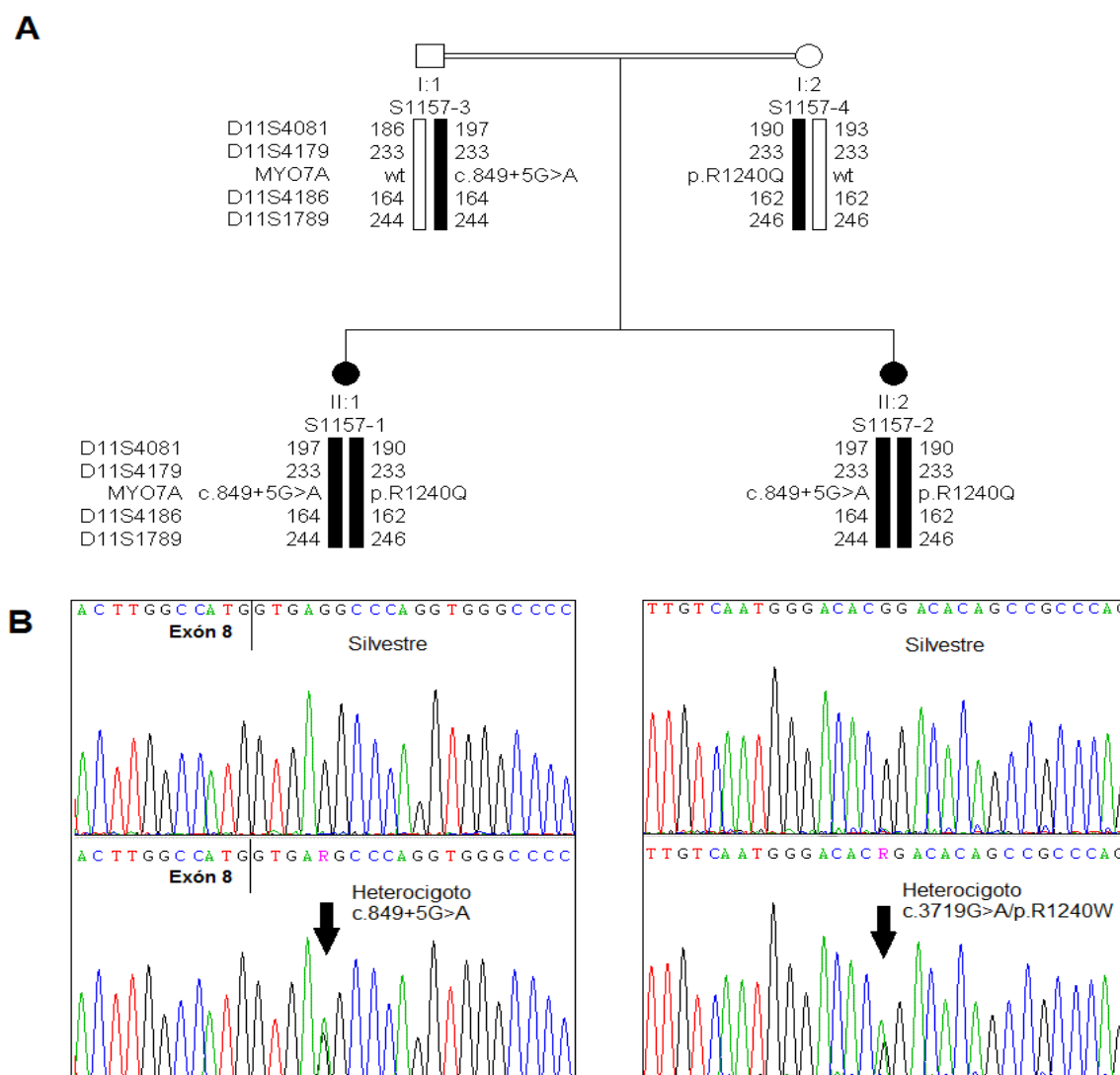


Figura 20. A. Árbol genealógico, análisis de haplotipos de la familia S1157 y segregación de las mutaciones. **B.** Electroferogramas de las mutaciones identificadas en el gen MYO7A en la familia S1157.

Sitio 5' Exón 8 Silvestre ATGgtgagg
MAXENT: 7.61 MDD: 11.68 MM: 7.53 WMM: 8.36

Sitio 5' Exón 8 Mutante ATGgtga**g**
MAXENT: 1.69 MDD: 6.68 MM: 4.76 WMM: 4.90

Figura 21. Análisis informático con el programa Maxentscan del sitio 5' donador del exón 8 con y sin la mutación. El valor que dan los 4 modelos probabilísticos (Maxent, MDD, MM y WMM) al sitio 5' con la mutación es siempre menor, por lo que la mutación puede afectar al splicing.

Para comprobar esta hipótesis realizamos ensayos funcionales con minigenes (véase sección 3.11). Se amplificó un fragmento de MYO7A en nuestro paciente que incluía el exón 8 del gen y parte de los intrones flanqueantes (la mutación se localiza próxima al sitio donador

5' de dicho exón). A posteriori se amplificó otro fragmento más grande que incluía desde el intrón 6 hasta el final del intrón 8 (véase apartado 3.11.1, Tabla 14 y Figura 16). Los fragmentos se ligaron al vector pSPL3 que incluye un promotor (de SV40) y dos exones (con sitios 5' donador y 3' aceptor fuertes), de forma que nuestro producto quedó flanqueado por los exones del plásmido. Se transfectaron células HeLa con la construcción. Tras la extracción del ARN y retrotranscripción se obtuvieron los ADNc. Se hizo PCR a 28 ciclos con cebadores marcados con fluorescencia (FAM) para resolver en el genotipador, y a 35 ciclos para secuenciar y comprobar que eran los productos esperados.

Se pudo observar que en el plásmido que llevaba el producto pequeño de PCR (que incluye sólo el exón 8 y un fragmento pequeño de los intrones flanqueantes) tanto en el silvestre como el mutante había *skipping* completo del exón 8. Esto nos hizo pensar en la existencia de algún tipo de elemento regulador, en las secuencias flanqueantes del exón 8, necesario para su correcto procesamiento. Esta hipótesis se ve apoyada por la puntuación baja que otorga el programa *Maxentscan* al sitio de *splicing* silvestre, ya que este tipo de sitios débiles suelen necesitar el apoyo de elementos reguladores.

Cuando repetimos el experimento utilizando el producto de PCR más extenso (desde el intrón 6 hasta el final del exón 8), se pudo comprobar que en el mutante se producía el 100% de *skipping* del exón 8 y en el silvestre sólo un 15 % (el experimento se realizó por duplicado) (Figuras 22 y 23).

El *skipping* del exón 8 produce la delección de 38 aminoácidos en fase (p.A246_M283del). La eliminación del exón 8 en el 15% de los transcritos silvestres sugiere que pudieran existir isoformas funcionales carentes de los aminoácidos codificados por este exón, que forman parte del dominio motor. Sea como fuere, la patogenicidad de la mutación residiría en la completa ausencia de isoformas con exón 8. Concluimos que la mutación c.849+5G>A es patogénica y que junto con la p.R1240Q son responsables de la hipoacusia en la familia.

Las hermanas afectas de la familia S1157 presentan una hipoacusia prelocutiva y profunda, con restos de audición sólo a la frecuencia de 125 Hz. Llegaron a consulta con 11 y 6 años respectivamente, con diagnóstico de HNSAR. No hemos podido volver a contactar con la familia para verificar un posible desarrollo de enfermedad retiniana.

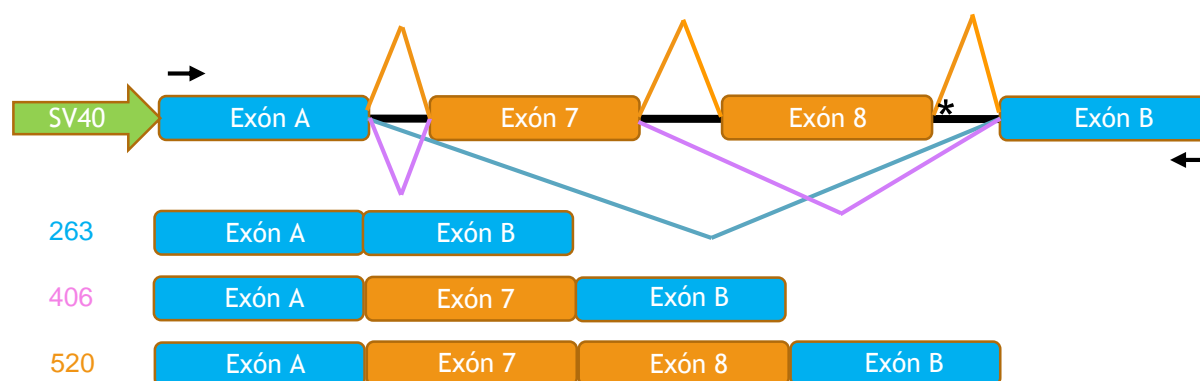


Figura 22. Esquema de la región del minigén incluida en el plásmido pSPL3. El asterisco representa la mutación. Los exones nombrados A y B corresponden al plásmido, los exones 7 y 8 son los de MYO7A. Se representan los posibles eventos de splicing, así como los tamaños que amplificaríamos en cada caso.

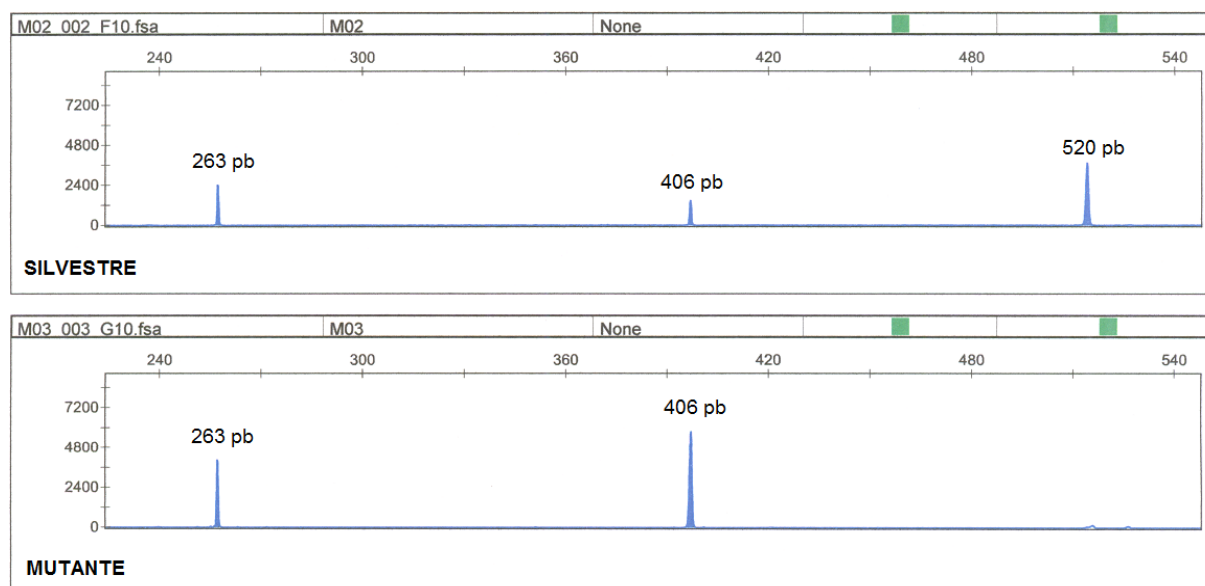


Figura 23. Resolución de fragmentos marcados con el fluoróforo FAM tras PCR a 28 ciclos del fragmento de interés. El primer pico correspondiente a 263 pb e incluye tan sólo los exones del plásmido (se ha producido skipping de los exones 7 y 8 de MYO7A). El segundo pico de 406 pb incluye los exones del plásmido y el exón 7 de MYO7A (skipping del exón 8), una pequeña proporción de la muestra silvestre y el total de la muestra mutante hacen skipping del exón 8. El tercer pico de 520 pb corresponde al procesamiento correcto de los dos exones del plásmido y los dos exones de MYO7A, sólo se observa este pico en la muestra silvestre.

4.2. Gen *PCDH15* (DFNB23)

Estudiamos las 77 familias españolas con HNSAR en las que se habían excluido mutaciones en el locus DFNB1. Las genotipamos para marcadores microsatélite próximos al gen (véase sección 3.6, Tabla 3) y se realizó el análisis de haplotipos. En 21 familias no se pudo excluir el ligamiento gen-enfermedad (había compatibilidad de ligamiento o no eran informativas). Añadimos 5 familias grandes de origen iraní en las que el equipo del *Institut Pasteur* (Francia) había demostrado ligamiento genético a la región donde reside el gen

PCDH15. En un individuo afecto de cada una de las 26 familias se secuenciaron todos los exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *PCDH15*. Se identificaron mutaciones claramente patogénicas en tres familias, dos de nuestra colección y una del *Institut Pasteur*. (Tabla 18).

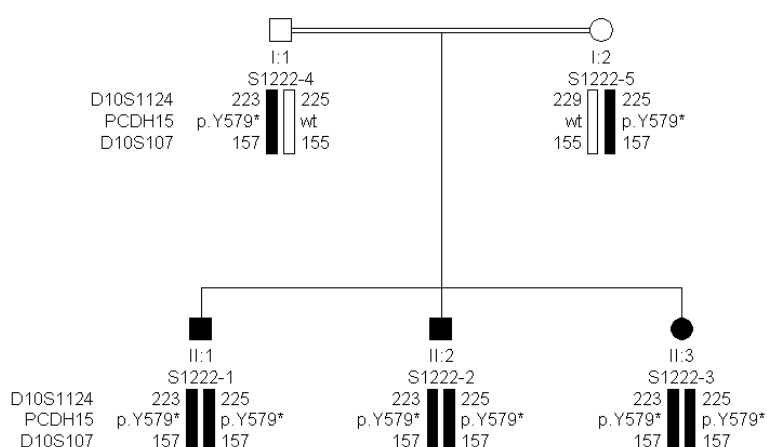
Tabla 18. Mutaciones patogénicas identificadas en el gen *PCDH15* tras genotipado y secuenciación directa de todos los exones del gen.

Familia	Mutación		
	ADNc	Proteína	Tipo
S1222	c.1737C>G	p.Y579*	Nonsense
S1430	c.400C>T	p.R134 ^{*(1)}	Nonsense
207	c.2029_2044del	p.D677lfs*5	Frameshift

Números de acceso NM_033056.3, NP_149045.3. ⁽¹⁾[Cremers et al., 2007].

La mutación c.1737C>G/p.Y579* se ha identificado en la familia S1222 en homocigosis en los tres hijos afectados y en heterocigosis en los padres sanos (Figura 24). No había sido previamente descrita. Se trata de una mutación *nonsense* y, si tenemos en cuenta la relación genotipo/fenotipo establecida en la literatura, se esperaría que produjera síndrome de Usher tipo 1. Cuando acudieron a consulta, las edades de los afectados estaban comprendidas entre 41 y 45 años, y aún no presentaban signos de retinosis pigmentaria. Volvimos a contactar con la familia tras identificar la mutación (habían pasado 8 años) y en dos de los tres afectados (S1222-1 y S1222-3) se había manifestado la RP.

A



B

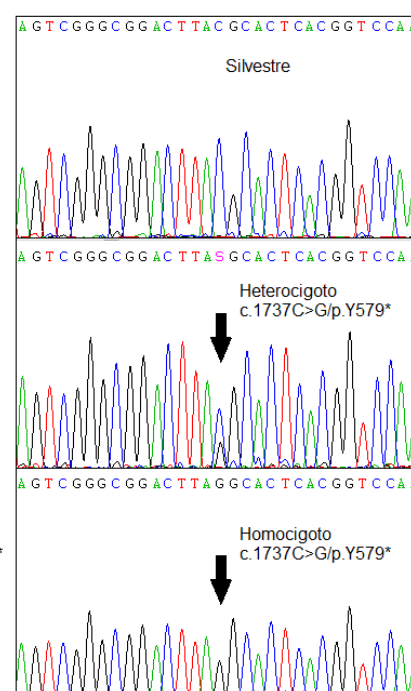


Figura 24. A. Análisis de haplotipos y segregación de la mutación c.1737C>G/p.Y579* en PCDH15. Los padres son heterocigotos para el cambio y los tres hijos afectados son homocigotos. **B.** Electroferogramas de la mutación identificada en el gen PCDH15, en la familia S1222..

La mutación c.400C>T/p.R134* se identificó en la familia S1430 de nuestra colección, en homocigosis en las dos hijas afectadas y en heterocigosis en los padres sanos (Figura 25). Se trata de una familia que no es consanguínea, por lo que parece que esta mutación es relativamente frecuente, ya que había sido previamente descrita como causante de síndrome de Usher [Cremers et al., 2007]. Si comparamos los haplotipos para marcadores genéticos próximos a la mutación p.R134*, no son iguales entre los dos cromosomas, por lo que no parece que esta mutación tenga su origen en un efecto fundador, sino que puede tratarse de una mutación recurrente. Las hijas afectas de esta familia llegaron a consulta en 2006 con 1 y 5 años, respectivamente, con diagnóstico de HNS. Al identificar la mutación, se volvió a contactar con la familia y se solicitó un fondo de ojo, descubriendo que estaban desarrollando retinosis pigmentaria (ahora tienen 10 y 14 años, respectivamente).

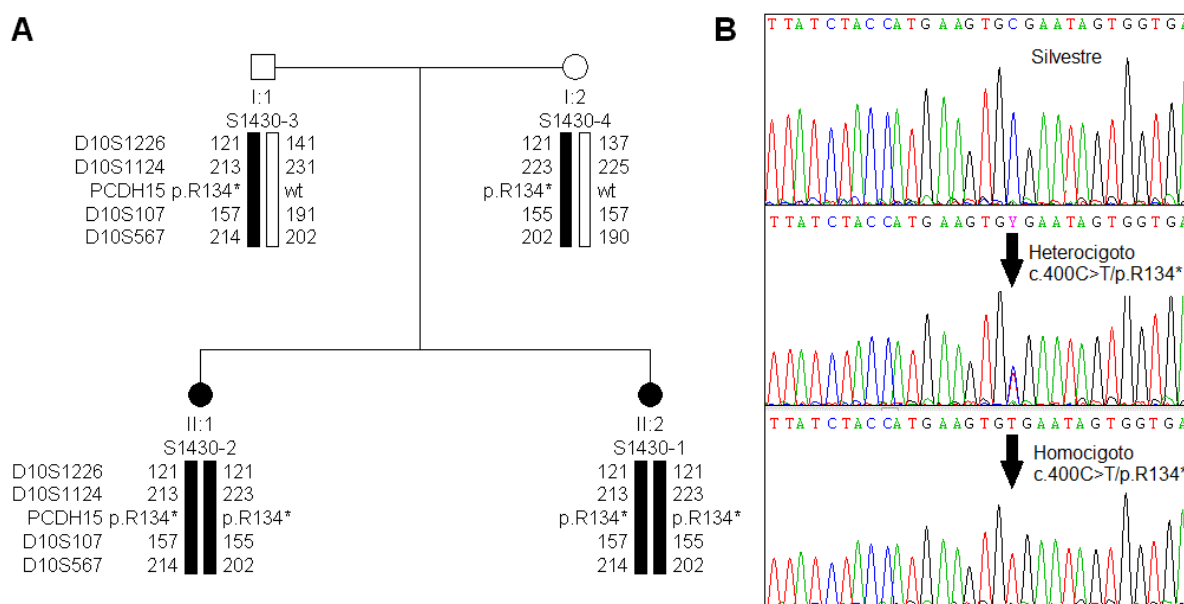


Figura 25. A. Análisis de haplotipos y segregación de la mutación c.400C>T/p.R134* en PCDH15. Los padres son heterocigotos para el cambio y las dos hijas afectas son homocigotas. **B.** Electroferogramas de la mutación identificada en el gen PCDH15, en la familia S1430.

La mutación c.2029_2044delGACAGGGAAAGCACTG/p.D677Ifs*5 es una delección de 16 pb que provoca un cambio en la pauta de lectura, lo que supone la sustitución de 4 aminoácidos y la aparición de un codón de parada prematuro (Figura 26). La mutación se ha identificado en la familia consanguínea iraní 207 (*Institut Pasteur*), que presentaba ligamiento a la región donde se encuentra PCDH15. Contamos con la muestra de un hijo afecto y de su madre sana, y se observó que el afecto lleva la mutación en homocigosis y la madre en heterocigosis. Se trata de un caso que, por el tipo de mutación (*frameshift*), se espera un diagnóstico final de síndrome de Usher. Sin embargo, no ha sido posible reevaluar la clínica de la familia.

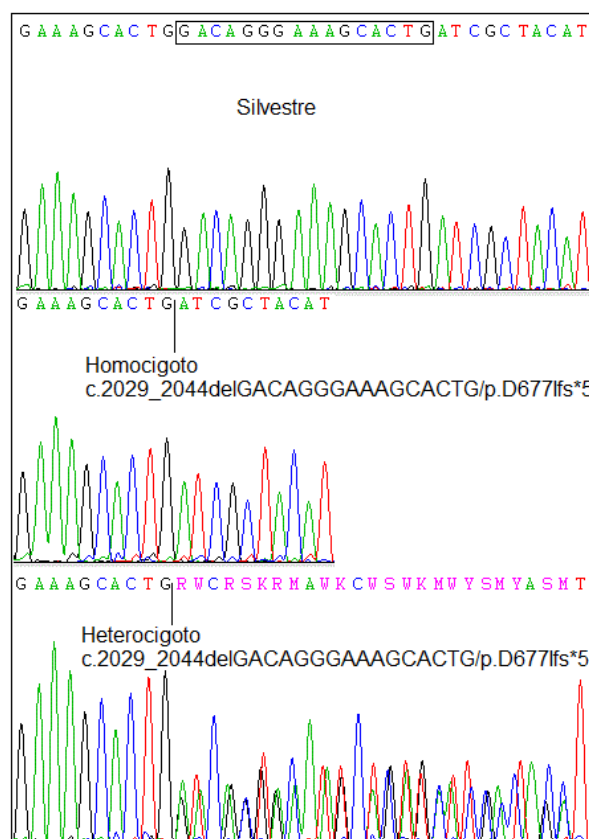


Figura 26. Electroferogramas silvestre, homocigoto y heterocigoto de los individuos de la familia iraní 207 para la mutación c.2029_2044del en *PCDH15*.

Por otra parte se estudiaron 80 casos esporádicos con HNSAR por análisis de heterodúplex en DHPLC, en los que se habían excluido mutaciones en el locus *DFNB1*. Se estudiaron el afecto y su madre (160 muestras) y se hizo análisis de heterodúplex para cada exón del gen *PCDH15* (véase sección 3.8, Tabla 11). Cuando se detectaron perfiles de elución diferentes a los de los controles, se secuenció por Sanger el exón en cuestión en el individuo a estudio. En los individuos en los que, completado el análisis de heterodúplex, se encontraba un solo alelo mutante, se han secuenciado todos los exones del gen para cubrir un posible fallo de detección de la metodología empleada.

Gracias a esta técnica se han podido identificar 7 variantes exónicas, tres poco frecuentes ($MAF < 0,003$) y cuatro ausentes en las bases de datos (Tabla 19). Todas las variantes *missense* identificadas son consideradas patogénicas al menos por un programa predictivo (*SIFT* o *Polyphen*, Tabla 19).

En todos estos individuos las mutaciones han aparecido en heterocigosis y sin segunda variante patogénica asociada, lo que hacía sospechar que podrían existir otras mutaciones que habrían escapado a la metodología de detección utilizada.

De hecho, se han descrito delecciones grandes en el gen *PCDH15* [Aller et al., 2010]. Para comprobar si la segunda mutación de alguno de estos pacientes era una delección grande

en heterocigosis, no detectable por secuenciación Sanger, se utilizó la tecnología del MLPA aplicando el *kit* comercial para *PCDH15* (SALSA MLPA P292). Se analizaron los 7 individuos que portaban una única mutación en heterocigosis (o dos cambios en *cis*) pero no se encontró ninguna delección.

Tabla 19. Mutaciones identificadas en *PCDH15* mediante análisis de heterodúplex en DHPLC.

Indiv.	Tipo	Estado	Mutación	SIFT	Polyphen	Conseq
E589-1	Missense	Heterocigosis	c.1039C>T/p.L347F (rs111033436)	0,07	0,998	8
E576-1	Missense	Heterocigosis	c.2581G>A/p.V861M (rs142512524)	0,04	0,983	6
E757-1	Inserción en fase	Heterocigosis	c.4317-4319dupGCC/ p.P1443dup (ND)	-	-	-
E516-1	Frameshift	Heterocigosis	c.4462_4468dupAATACTA/ p.I1490Kfs*4 (ND)	-	-	-
E610-1	Missense	Heterocigosis	c.4911G>C/p.E1637D (ND)	0,16	0,859	5
E505-1	Delección en fase	Heterocigosis	c.5284-5292delCCTGCTCCT/ p.P1762_P1764del (rs373916538)	-	-	-
E689-1	Missense	Heterocigosis	c.5603C>T /p.T1868M (ND)	0	0,696	1

Números de acceso: NM_033056.3, NP_149045.3.

Lo siguiente que nos planteamos fue una posible herencia digénica *PCDH15-CDH23*, ya que se han descrito casos tanto de sordera no sindrómica como de síndrome de Usher, en los que un solo alelo mutado del gen *PCDH15* y otro alelo mutado del gen *CDH23* son suficientes para producir la enfermedad. La herencia digénica *PCDH15-CDH23* también se ha observado en un modelo murino [Zheng et al., 2005]. Para comprobar si en nuestros individuos existía herencia digénica, secuenciamos todos los exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *CDH23* en los 7 individuos, pero no encontramos ningún cambio patogénico.

De las 7 variantes identificadas en heterocigosis sin segunda mutación asociada, dos afectarían a los dominios cadherina 3 y 8, respectivamente, mientras que 5 de ellas corresponderían con el dominio citosólico (véase sección 1.5.2, Figura 11). Las distintas isoformas de procadherina-15 se diferencian básicamente en este dominio intracelular, codificado por exones alternativos. Esto pudiera indicar que los efectos de las mutaciones indicadas en los exones exclusivos de las isoformas largas, sean leves o inocuos.

4.3. Gen *CDH23* (DFNB12)

Estudiamos las 77 familias españolas con HNSAR en las que se habían excluido mutaciones en el locus DFNB1. Las genotipamos para marcadores microsatélites próximos al gen *CDH23* (véase sección 3.6, Tabla 4) y se realizó el análisis de haplotipos. En 23 familias no se pudo excluir el ligamiento gen-enfermedad (había compatibilidad de ligamiento o no eran informativas). En un individuo afecto de cada una de ellas se secuenciaron los 69 exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *CDH23*. Tras ello, se identificó la posible causa de la hipoacusia en una familia, la familia S913 (Tabla 20).

En paralelo estudiamos 80 casos esporádicos (familias con un solo afectado) mediante análisis de heterodúplex en DHPLC para todos los exones del gen *CDH23* (véase sección 3.8, Tablas 12 y 13). En cada caso seleccionamos un individuo afectado y su madre (160 individuos en total). En todos ellos se habían excluido mutaciones en el locus DFNB1. Pasamos a secuenciar el exón en cuestión en los individuos con perfiles de elución diferencial. Con esta metodología se pudo identificar la causa de la hipoacusia en una de las familias, la E732 (Tabla 20).

Tabla 20. Casos elucidados por el hallazgo de mutaciones en el gen *CDH23*.

Familia	Tipo	Estado	Mutación	SIFT	Polyphen	Conseq
S913	<i>Frameshift</i>	Homocigosis	c.2950delC/ p.H984Mfs*5	-	-	-
E732	Inserción en fase	Heterocigosis	c.6124_6126dup/ p.L2042dup	-	-	-
	<i>Missense</i>	Heterocigosis	c.7903G>T/ p.V2635F ⁽¹⁾	0,14	1	8

Números de acceso: NM_022124.5, NP_071407.4. ⁽¹⁾[Brownstein et al. 2011].

En la familia consanguínea S913, hemos identificado la mutación c.2950delC/p.H984Mfs*5. Se trata de una mutación tipo *frameshift* que se encuentra en homocigosis en los afectados y en heterocigosis en los padres y el hermano sano por lo que segrega con la enfermedad (Figura 27). La hipoacusia en estos pacientes es profunda, con 90 dB de pérdida en 250 Hz y sin restos de audición en otras frecuencias. Se trata de una mutación que, según la relación genotipo-fenotipo establecida para *CDH23*, debería producir síndrome de Usher. Los 3 afectados de la familia acudieron a nuestra consulta a las edades de 22, 28 y 38 años respectivamente, y en ese momento no presentaban otros signos clínicos aparte de la hipoacusia. Tras identificar la mutación volvimos a contactar con la familia (habían pasado 10 años) y los hijos afectados habían empezado a padecer RP.

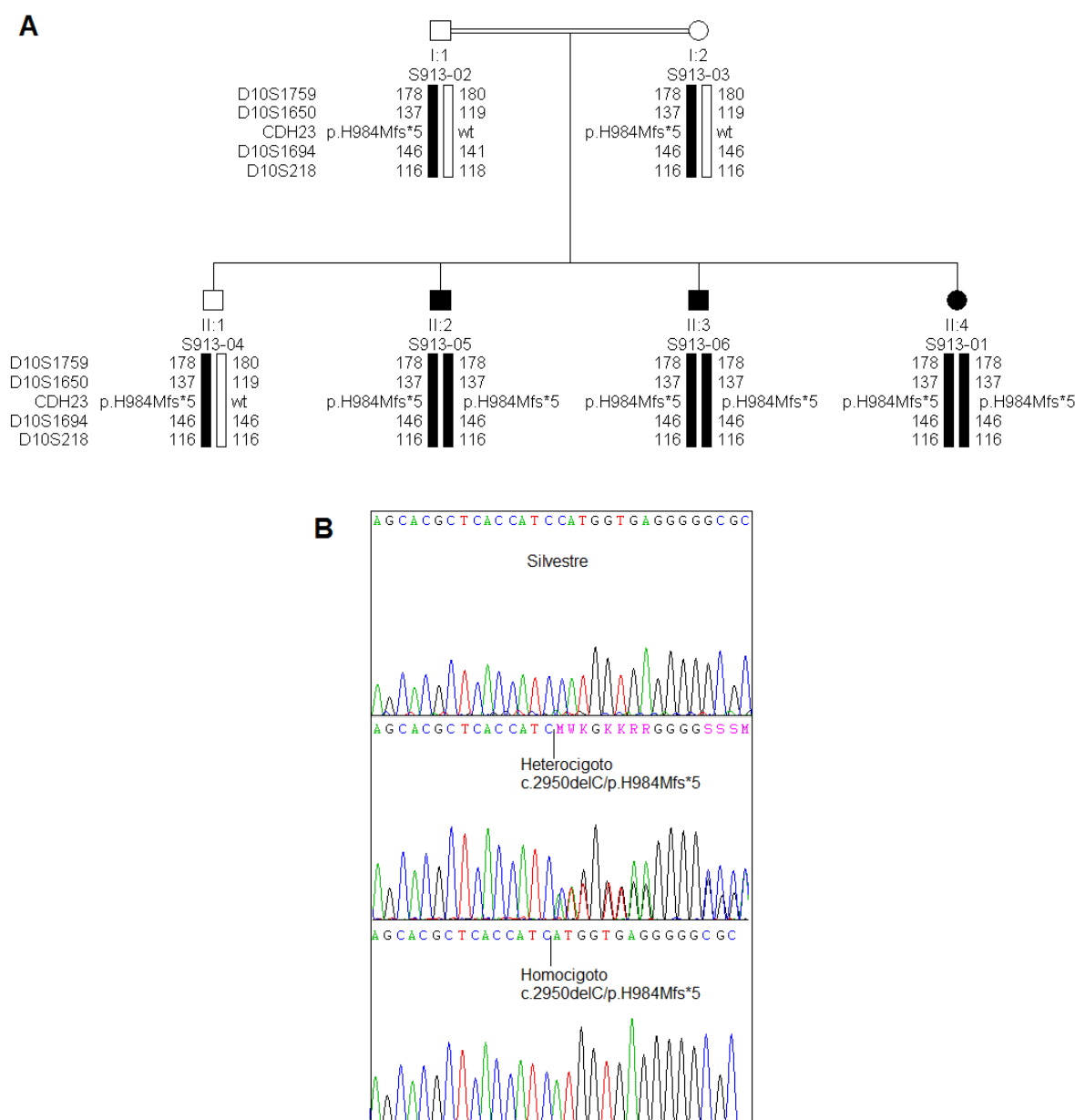


Figura 27. A. Análisis de haplotipos y segregación de la mutación *c.2950delC/p.H984Mfs*5* en el gen *CDH23* de la familia consanguínea S913. **B.** Ejemplos de electroferogramas de individuos silvestre, homocigoto y heterocigoto para la mutación.

El probando de la familia E732 lleva las mutaciones *c.6124_6126dup/p.L2042dup* y *c.7903G>T/p.V2635F* en heterocigosis compuesta, las mutaciones afectan a dos dominios cadherina. La variante *c.6124_6126dup/p.L2042dup* es una inserción en fase de un aminoácido, que no había sido descrito previamente en la literatura ni aparece en las bases de datos de 1000Genomas y NHLBI-ESP. La mutación *c.7903G>T/p.V2635F* es una mutación *missense* y ha sido descrita como patogénica [Brownstein et al. 2011]. El cambio *c.7903G>T/p.V2635F* se había identificado en dos familias argelinas, una de ellas con 12 miembros (9 afectados y 3 sanos), y segrega en ambos casos con la enfermedad. Dichas familias presentaban hipoacusia profunda de herencia autosómica recesiva sin otros signos

clínicos asociados. Este individuo presenta HNSAR prelocutiva, leve en frecuencias graves y profunda en frecuencias agudas. Se ha descrito que los pacientes con mutaciones en *CDH23* que padecen síndrome de Usher presentan una hipoacusia más grave que los pacientes con HNS [Pennings, 2004]. Las audiometrías de pacientes con HNS de la literatura son muy similares a las de este paciente, con caída en agudos (Figura 28). El paciente tiene actualmente 16 años y no tiene RP. Todos los datos obtenidos apuntan a que es un verdadero caso de HNSAR.

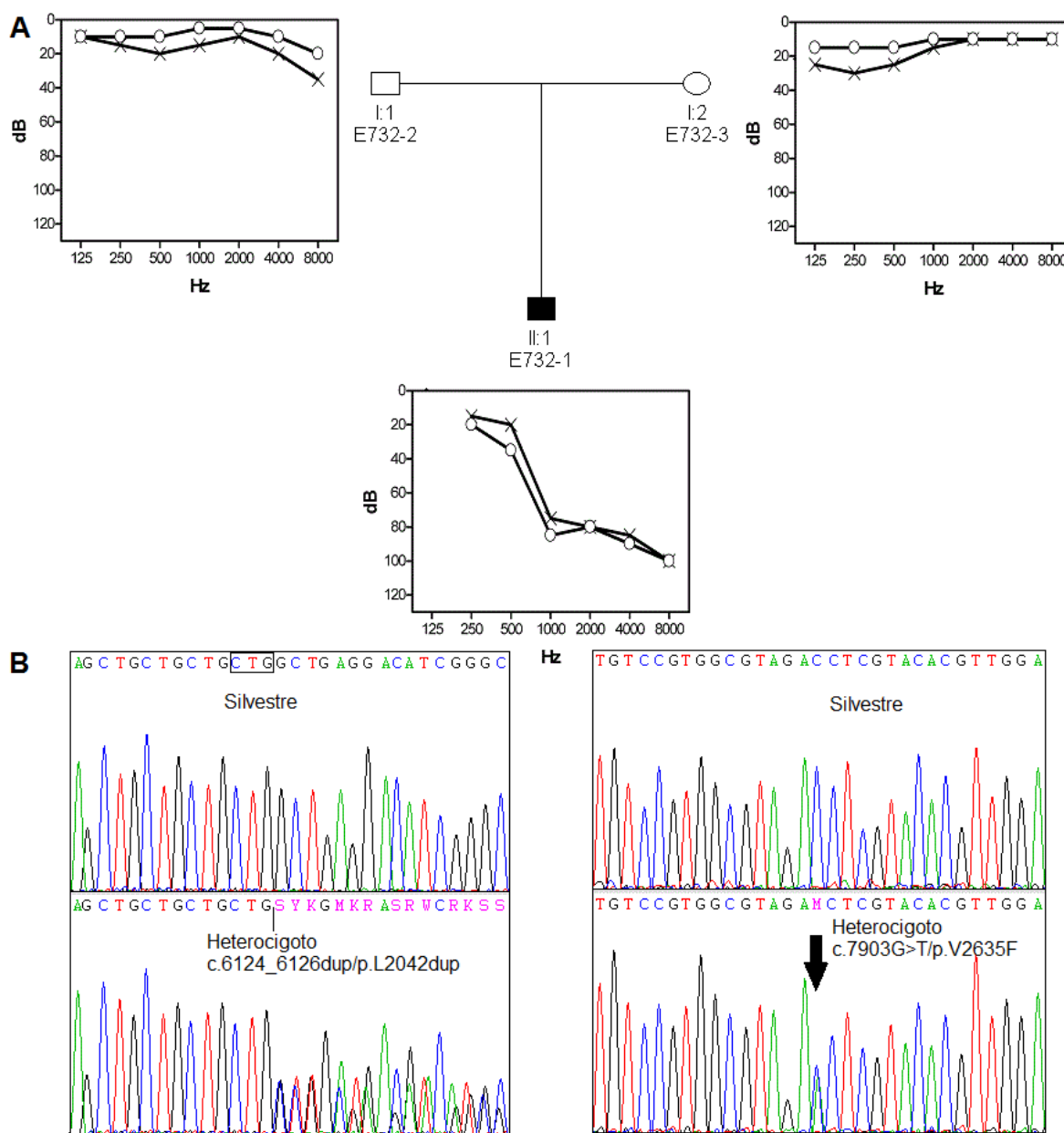


Figura 28. A. Árbol y audiometrías de la familia E732. Los padres presentan audiometrías normales, y el paciente tiene una hipoacusia que va de leve a profunda, con mayor afectación en las frecuencias agudas. **B.** Electroferogramas de las mutaciones identificadas en el gen CDH23 en la familia E732.

En otros 8 casos esporádicos identificamos cambios potencialmente patogénicos en heterocigosis sin segunda mutación acompañante (Tabla 21). Seis de ellos no habían sido descritos en la literatura ni aparecían en las bases de datos de 1000Genomas ni NHLBI-ESP. Se secuenciaron en estos 8 pacientes todos los exones y regiones intrónicas flanqueantes de *CDH23* por si alguna variante hubiese escapado a la detección en el análisis de heterodúplex, pero no identificamos más cambios.

Tabla 21. Cambios identificados en el gen *CDH23* tras heterodúplex en DHPLC y secuenciación de perfiles de elución distintos de los controles silvestres y controles de polimorfismos para cada exón.

Individuo	Tipo de mutación	Estado	ADNc/Prot	SIFT	Polyphen	Conseq
E510-1	Missense	Heterocigosis	c.446C>T/p.T149M ⁽¹⁾	0,01	1	6
E588-1	Missense	Heterocigosis	c.2032G>A/p.V678I	0,17	0,011	4
E606-1	Missense	Heterocigosis	c.956G>A/p.R3189Q	0,01	0,999	9
E640-1	Missense	Heterocigosis	c.8305G>A/p.A2769T	0,04	0,999	9
E641-1	Missense	Heterocigosis	c.4468C>A/p.L1490M	0,02	0,979	1
E674-1	Missense	Heterocigosis	c.4147G>A/p.D1383N	0,11	0,195	7
E694-1	Missense	Heterocigosis	c.3178C>T/p.R1060W ⁽²⁾	0,02	1	9
E739-1	Missense	Heterocigosis	c.550C>T/p.R184C	0,03	0,994	6

Números de acceso: NM_022124.5, NP_071407.4. ⁽¹⁾En base de datos NHLBI-ESP identificada en 1 de 7000 exomas. ⁽²⁾[Astuto et al., 2002b].

4.4. Gen *PJVK* (DFNB59)

Estudiamos las 77 familias españolas con HNSAR en las que se habían excluido mutaciones en el locus DFNB1. Las genotipamos para marcadores microsatélites próximos al gen *PJVK* (Tabla 5) y tras el análisis de haplotipos no se pudo excluir el ligamiento gen-enfermedad en 22 de ellas (había compatibilidad de ligamiento o no eran informativas). Por otra parte seleccionamos 84 casos esporádicos (40 españoles, 23 italianos y 21 daneses) con neuropatía auditiva (NA) ya cribados para el gen *OTOF*. En estos 106 pacientes se secuenciaron los 7 exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *PJVK*. Pudimos identificar la causa de la hipoacusia en 3 casos: una familia española de HNSAR y dos casos esporádicos de NA, uno italiano y otro danés (Tabla 22).

Tabla 22. Mutaciones identificadas en el gen *PJVK*

Individuos	Tipo	Mutación	Estado	SIFT	Polyphen	Conseq
S269-3 y 4 (España)	Missense	c.671T>G/ p.L224R	Heterocigosis	0,02	0,959	7
	Frameshift	c.880delC/ p.H294Ifs*43	Heterocigosis	-	-	-
E1471-1 (Italia)	Missense	c.880C>G/ p.H294D	Heterocigosis	0,02	0,981	8
	Frameshift	c.950delT/ p.F317Sfs*20	Heterocigosis	-	-	-
DAN7 (Dinamarca)	Missense	c.1028G>C/ p.C343S ⁽¹⁾	Homocigosis	0	0,981	8

Números de acceso: NM_001042702.3 y NP_001036167.1.

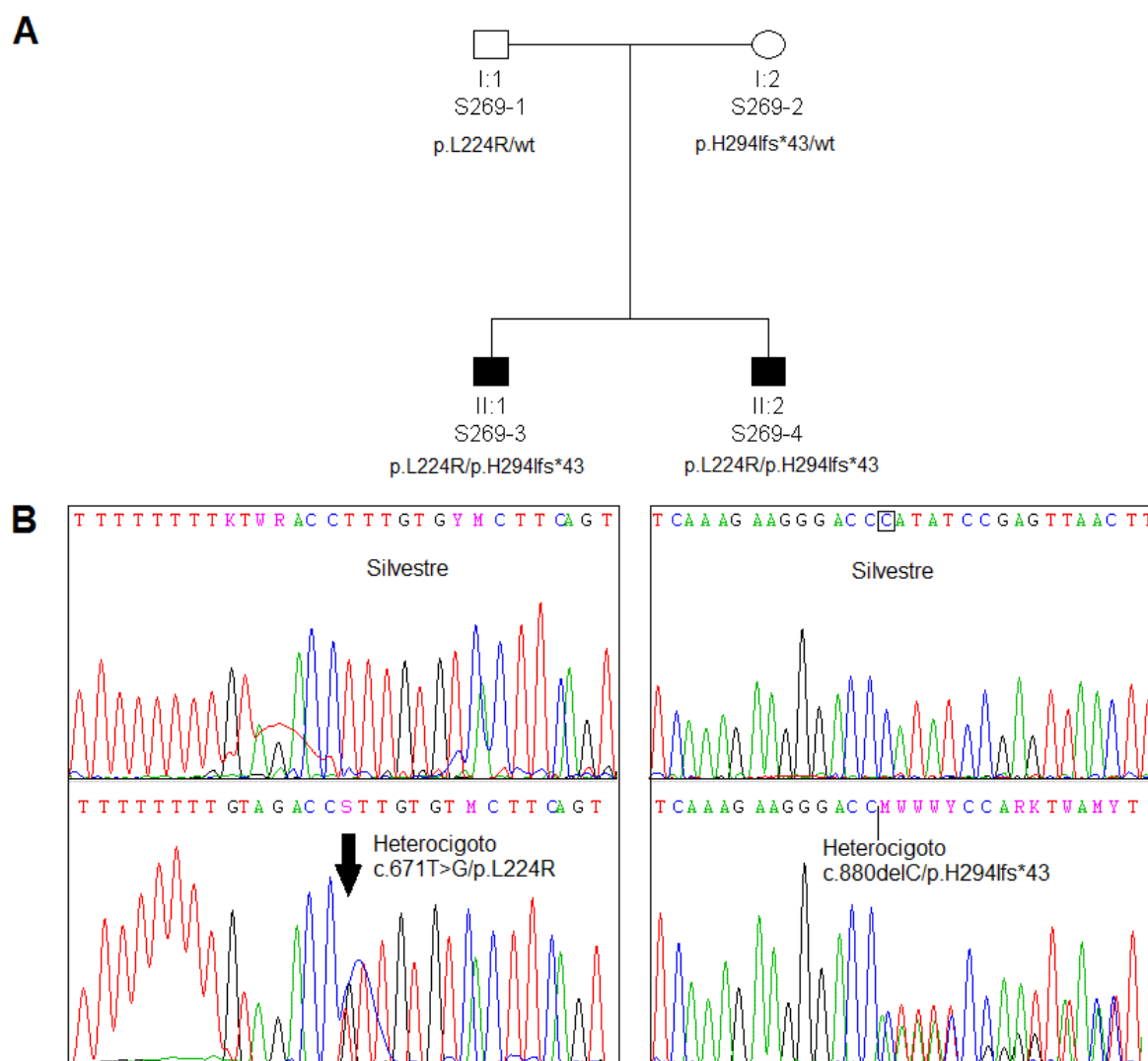
⁽¹⁾[Mujtaba et al., 2012]

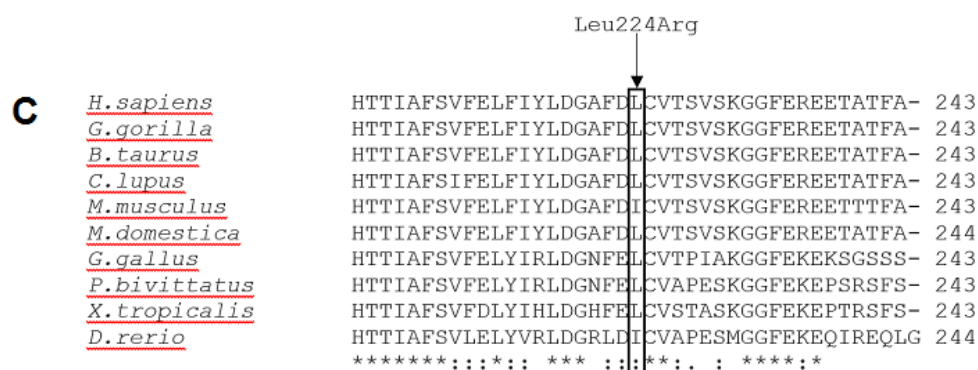
Los dos hermanos afectados de la familia S269 llevan en heterocigosis compuesta las variantes c.671T>G/p.L224R y c.880delC/p.H294Ifs*43. El padre es portador de p.L224R y la madre, de p.H294Ifs*43 (Figura 29). Ninguna de las dos mutaciones había sido descrita en la literatura. Los hermanos afectados de esta familia no habían sido sometidos al cribado neonatal de hipoacusia, la cual se detectó en el hermano mayor a la edad de 4 años. Los dos afectados presentan hipoacusia severa y estable y OEA negativas, por lo que no se trata de un caso de neuropatía auditiva.

El paciente italiano E1471-1 lleva en heterocigosis compuesta los cambios c.880C>G/p.H294D y c.950delT/p.F317Sfs*20. Su padre es portador de p.F317Sfs*20 y su madre, de p.H294D. Ninguno de los dos cambios había sido descrito en la literatura. (Figura 30). El individuo E1471-1 tampoco fue sometido al cribado neonatal y se detectó la hipoacusia a la edad de 2 años. La hipoacusia es profunda. Presenta PEATC negativos y OEA positivas, tratándose por tanto de un caso de NA.

El individuo DAN7 pertenece a la cohorte reclutada en Dinamarca, pero es de origen étnico tamil. Es homocigoto para la mutación *missense* c.1028G>C/p.C343S (Figura 31). Esta mutación ya había sido descrita como patogénica en una familia consanguínea pakistaní, pero en ese estudio no se investigó la posible existencia de neuropatía auditiva [Mujtaba et al., 2012]. El paciente DAN7 presenta PEATC negativos y OEA positivas, tratándose por tanto de otro caso de NA. El paciente recibió un implante coclear. La evaluación del implante a los 7 meses de su realización indica resultados satisfactorios, pero el seguimiento del paciente continúa.

Dos de las mutaciones nuevas son deleciones de una sola base que producen cambio de la pauta de lectura y darían lugar a proteínas truncadas o degradación del ARNm (*nonsense mediated decay*, degradación mediada por codón de parada prematuro). Las otras dos mutaciones nuevas, y la mutación ya descrita son *missense*. Afectan a residuos evolutivamente conservados (*Conseq* en Tabla 22 y Figuras 29-C, 30-C y 31-C) y tanto *SIFT* como *Polyphen* las clasifican como patogénicas (Tabla 22). En todos los casos, las mutaciones segregan con la enfermedad siguiendo un patrón de herencia autosómico recesivo. Además no estaban presentes en 50 controles normoyentes españoles, y en las bases de datos NHLBI Exome Sequencing Project y 1000-Genomas dos aparecen con muy bajas frecuencias (MAF<0,0001 de la p.L224R y MAF<0,001 de la p.C343S) y una no aparece (p.H294D).





(cont.) **Figura 29. C.** Conservación del aminoácido afectado por el cambio missense. Nótese que *PJVK* es un gen exclusivo de vertebrados. Secuencias utilizadas respectivamente: NP_001036167.1, XP_004032916.1, NP_001180112.1, XP_535979.2, NP_001074180.1, XP_001368857.1, XP_426573.2, XP_007433246.1, XP_012826511.1 y XP_009300492.1.

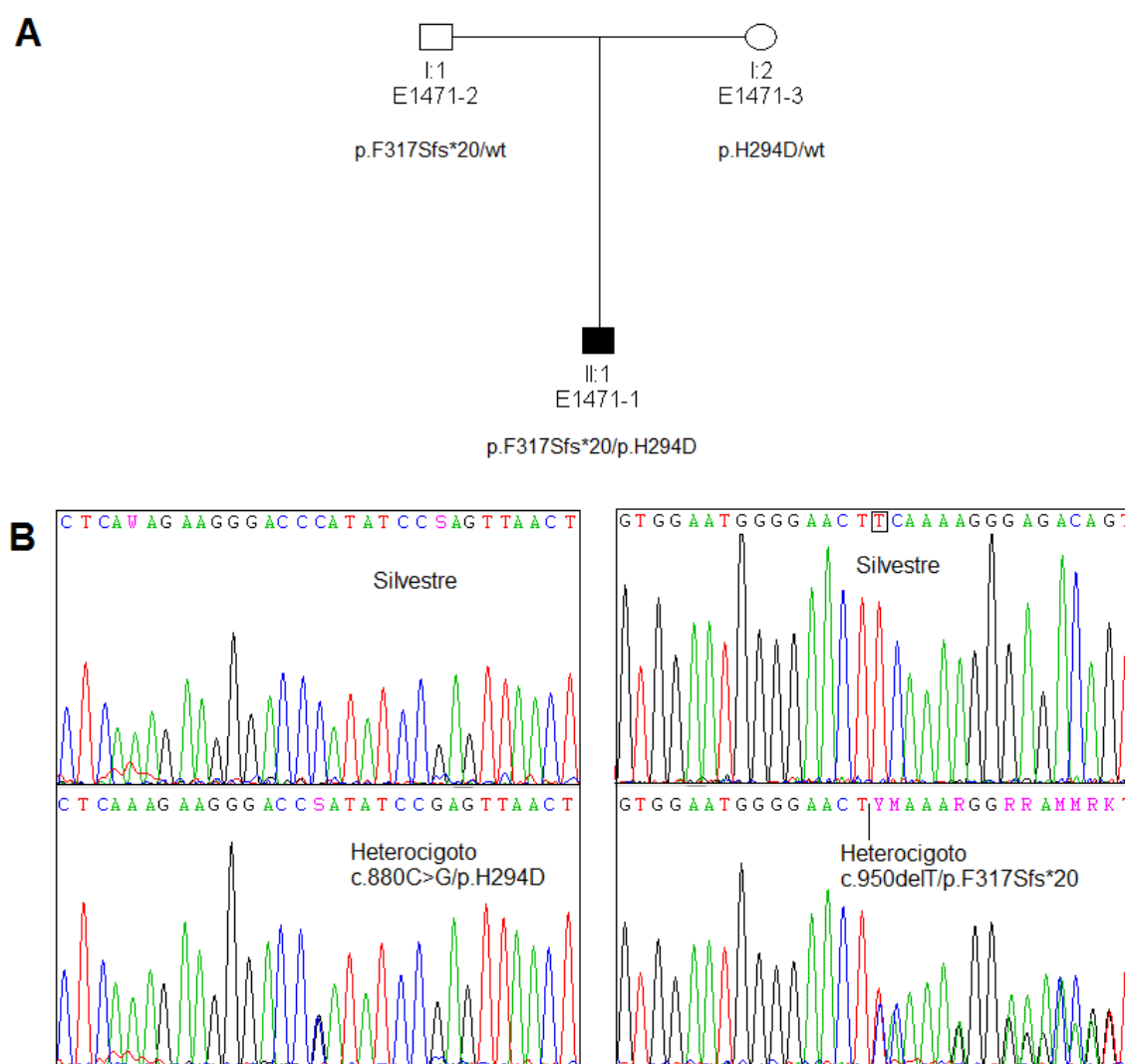
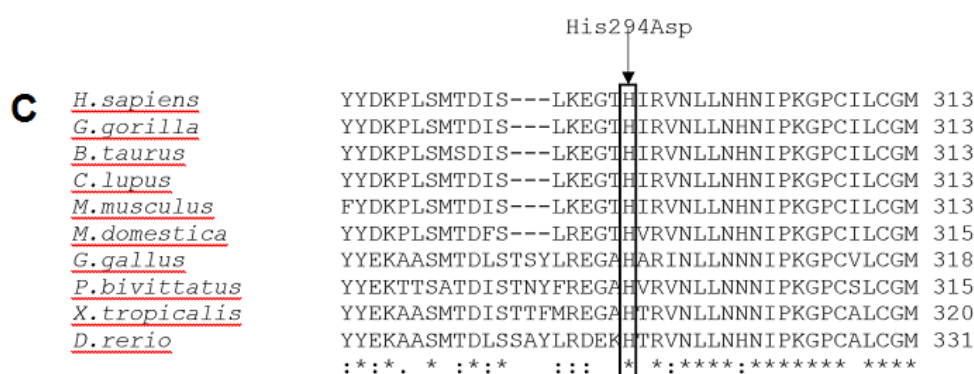


Figura 30. A. Árbol genealógico de la familia E1471 y segregación de mutaciones. **B.** Electroferogramas de las mutaciones identificadas en el gen *PJVK* en la familia E1471.



(cont.) **Figura 30. C.** Conservación del aminoácido afectado por el cambio missense. Nótese que PJKV es un gen exclusivo de vertebrados. Secuencias utilizadas respectivamente: NP_001036167.1, XP_004032916.1, NP_001180112.1, XP_535979.2, NP_001074180.1, XP_001368857.1, XP_426573.2, XP_007433246.1, XP_012826511.1 y XP_009300492.1.

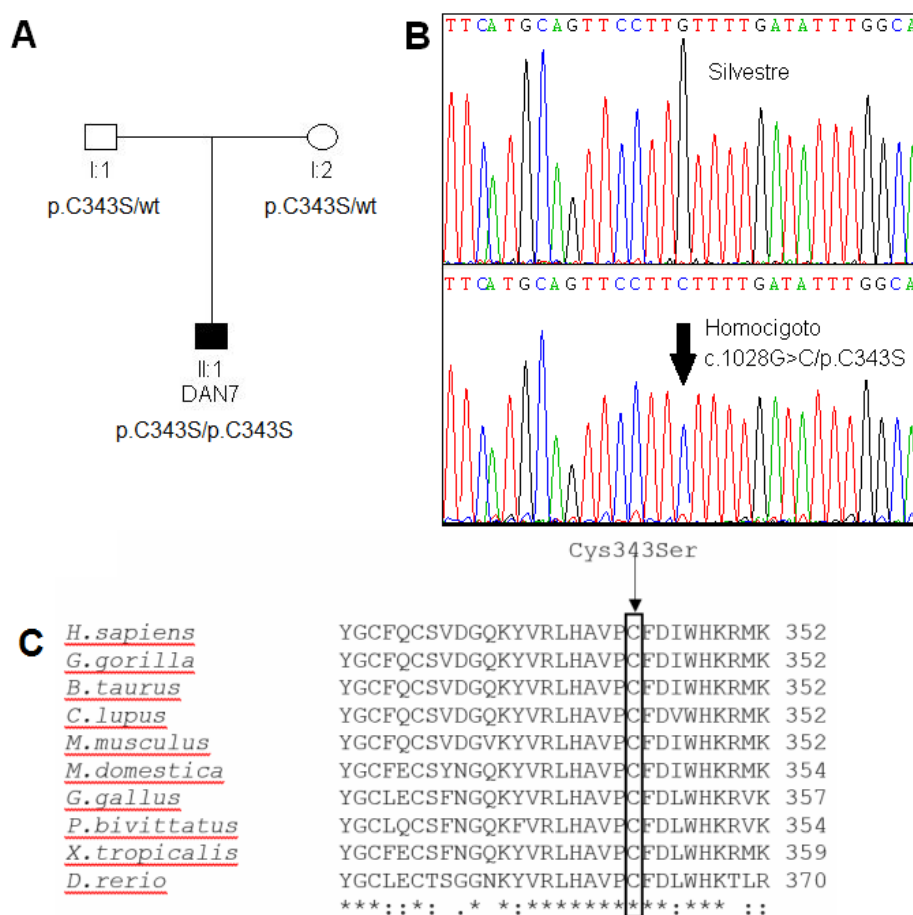


Figura 31. A. Árbol genealógico y segregación de la mutación en la familia danesa. **B.** Electroferogramas de un individuo silvestre y del individuo DAN7 homocigoto para el cambio c.1028C>G/p.C343S en PJKV. **C.** Conservación del aminoácido cisteína 343 entre las diferentes especies. Nótese que PJKV es un gen exclusivo de vertebrados. Secuencias utilizadas respectivamente: NP_001036167.1, XP_004032916.1, NP_001180112.1, XP_535979.2, NP_001074180.1, XP_001368857.1, XP_426573.2, XP_007433246.1, XP_012826511.1 y XP_009300492.1.

4.5. Investigación de nuevos casos mediante un panel NGS de genes de hipoacusia

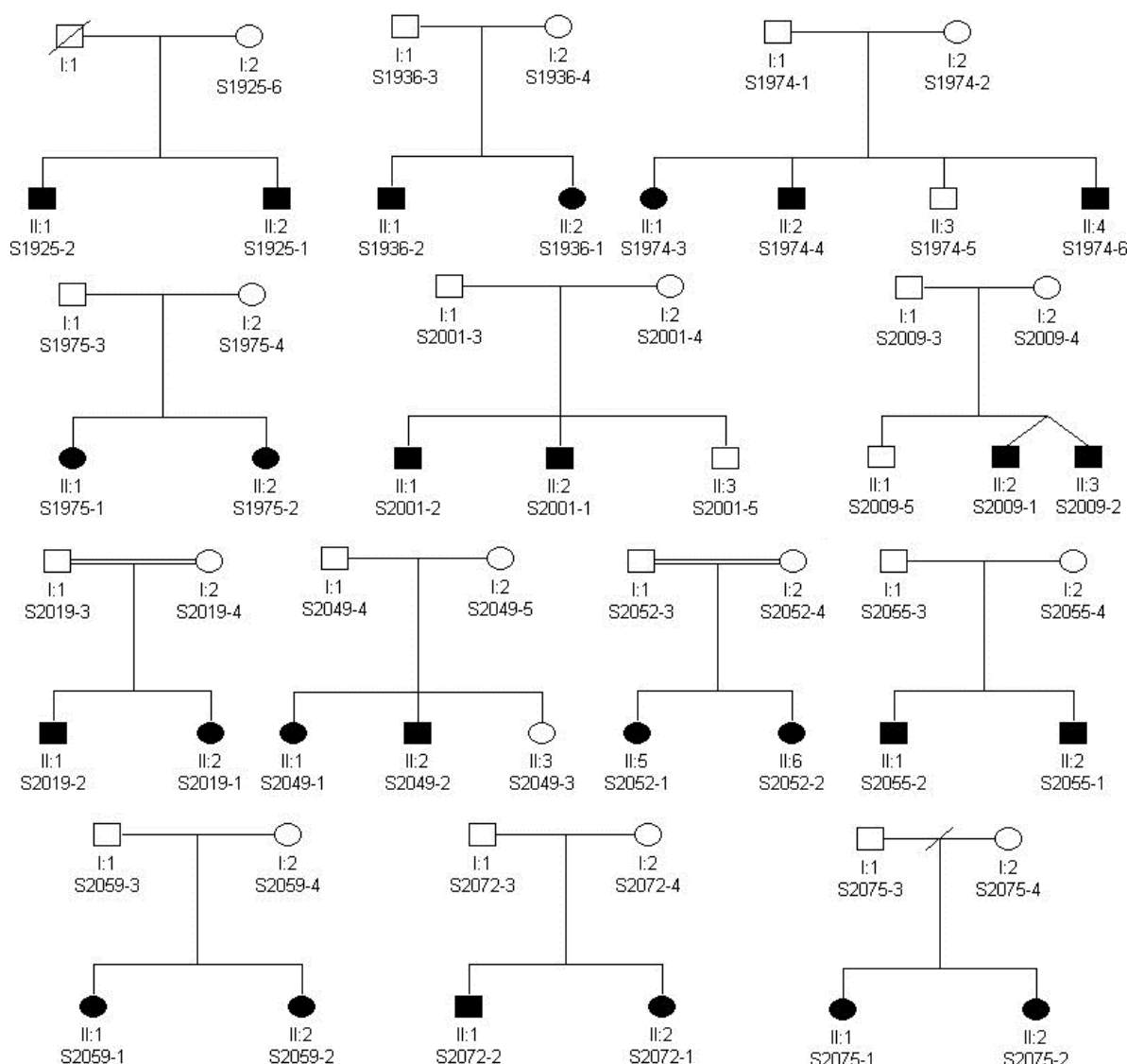


Figura 32. Árboles genealógicos de las 13 familias de las que hemos seleccionado un individuo afecto para la secuenciación del panel de genes de hipoacusia.

Con la implementación de la secuenciación de nueva generación o NGS (*Next Generation Sequencing*) el trabajo que por la metodología clásica podía llevar años hoy se puede hacer en pocos días. Aunque la ventaja más notable del uso de estos paneles es el ahorro de tiempo, también conllevan un ahorro económico, puesto que la secuenciación Sanger para una gran batería de genes es también más cara. La identificación de nuevos genes de HNSAR requiere la investigación de casos familiares en los que se haya excluido la implicación de los genes conocidos. Decidimos utilizar la secuenciación masiva de los genes incluidos en el *OTO-NGS-panel* (véase sección 3.13, Tabla 16), diseñado en nuestro

laboratorio, para filtrar los nuevos casos que nos habían llegado antes de proceder a análisis de exoma completo.

Seleccionamos 13 individuos con HNSAR, (pertenecientes a familias no relacionadas (Figura 32), que habían dado negativo en los test de diagnóstico rutinarios, para la secuenciación del panel de genes de hipoacusia. En todos los casos, las variantes detectadas a través del panel, se han comprobado por secuenciación Sanger y se ha hecho la segregación en la familia.

Como resultado, hemos elucidado la causa de la hipoacusia en 6 de los 13 pacientes (Tabla 23).

Tabla 23. Pacientes elucidados tras la utilización del panel de genes de hipoacusia en 13 individuos.

Individuo	Gen	Tipo	Cambio	Estado	SIFT	Polyphen	Conseq
S1936-1	<i>TMPRSS3</i>	Missense Missense	c.413C>A/p.A138E ⁽¹⁾ c.1139T>C/p.I380T	Heterocigosis Heterocigosis	0 0	0,6 0,9	7 7
S2001-1	<i>SLC26A4</i>	Nonsense	c.1034T>A/p.L345*	Homocigosis	-	-	-
S2019-2	<i>MYO15A</i>	Frameshift	c.6003delG/ p.E2002Rfs*27	Homocigosis	-	-	-
S2055-2	<i>MYO7A</i>	Frameshift	c.2868_2872delGCCAG/ p.Q959Gfs*5 ⁽²⁾	Homocigosis	-	-	-
S2059-1	<i>CDH23</i>	Missense Missense	c.901C>T/p.R301W c.1996G>A/p.D666R	Heterocigosis Heterocigosis	0 0,01	0,99 0,9	8 9
S2072-2	<i>TECTA</i>	Missense	c.2657A>G/p.N886S ⁽³⁾	Homocigosis	0,46	0,98	9

Números de acceso: NM_024022.2 *TMPRSS3*, NM_000441.1 *SLC26A4*, NM_016239.3 *MYO15A*, NM_000260.3 *MYO7A*, NM_022124.5 *CDH23* y NM_005422.2 *TECTA*.

⁽¹⁾[Weegerink et al., 2011] ⁽²⁾[Blanchet et al., 2007] ⁽³⁾[Hildebrand et al., 2011].

En la familia S1936 segregan dos mutaciones de tipo *missense* en el gen *TMPRSS3* (DFNB8/10). La mutación c.413C>A/p.A138E, ya descrita como patogénica [Weegerink et al., 2011], y la c.1139T>C/p.I380T, que no había sido descrita previamente en la literatura. Afecta al dominio serín-proteasa y los programas de predicción de patogenicidad la consideran patogénica (Tabla 23). La hipoacusia en los pacientes DFNB8/10 puede ser progresiva (dependiendo de las mutaciones) y comienza siempre con pérdida de audición en las frecuencias agudas [Weegerink et al., 2011]. Los afectados de la familia S1936 (el mayor con 9 años) presentan una hipoacusia progresiva con caída en agudos (Figura 33). Todos estos datos apuntan a que la hipoacusia en esta familia tiene su origen en las mutaciones del gen *TMPRSS3*.

En la familia S2001 segrega la mutación c.1034T>A/p.L345* (*SLC26A4*). El cambio no había sido descrito en la literatura, pero por su naturaleza truncante es claramente patogénico.

Las mutaciones en *SLC26A4* pueden producir tanto HNS (DFNB4) como síndrome de Pendred. Este es un caso que llegó como HNSAR, pero en el que finalmente se pudo confirmar una clínica de síndrome de Pendred. Los pacientes presentan signos característicos: acueducto vestibular dilatado, acúfenos, alteraciones del equilibrio e hipotiroidismo.

En la familia consanguínea S2019 hemos identificado el cambio c.6003delG/ p.E2002Rfs*27 en el gen *MYO15A*. Se trata de un cambio aún no descrito en la literatura pero bastante frecuente en España, puesto que en trabajos previos de nuestro laboratorio ya lo habíamos identificado en otras dos familias. Por su naturaleza truncante es un cambio claramente patogénico, y explicaría la hipoacusia en la familia.

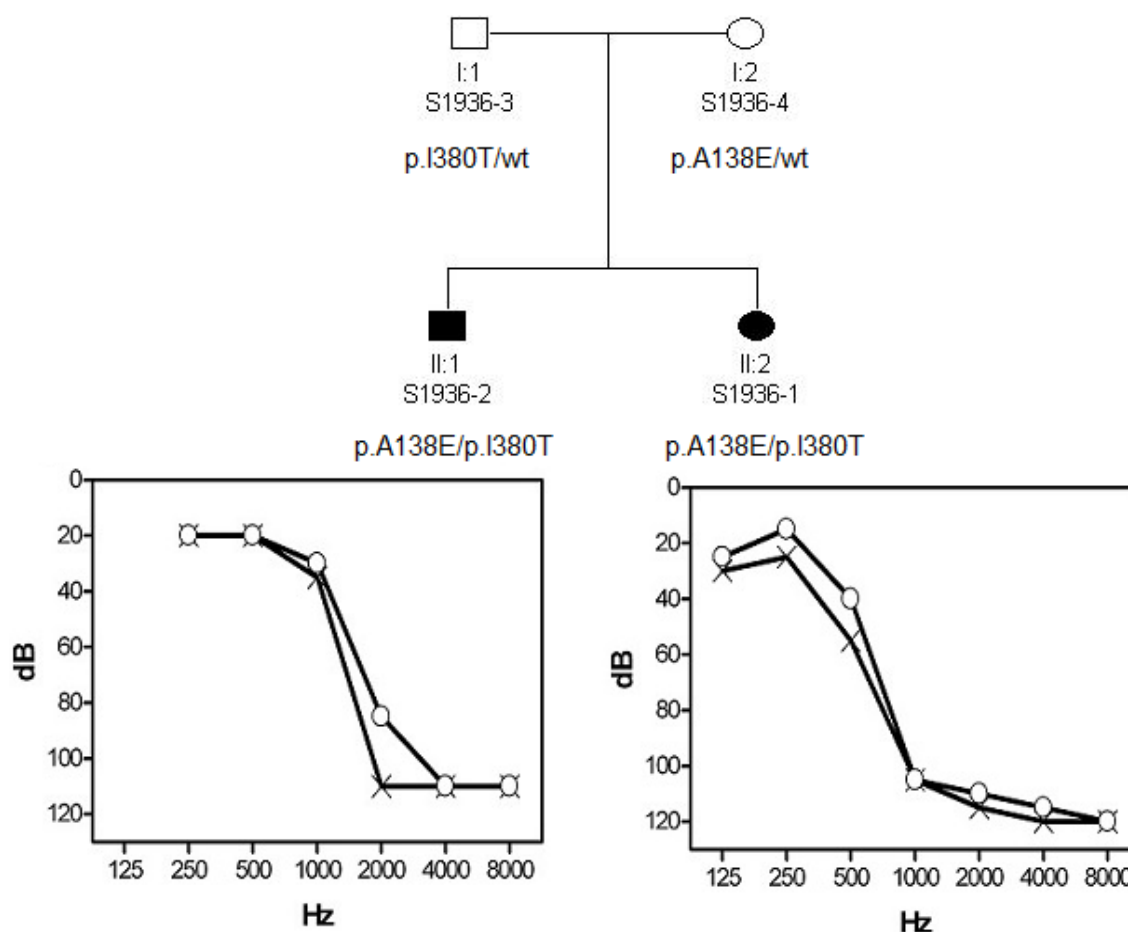


Figura 33. Árbol y audiogramas de los individuos afectados de la familia S1936 elucidada por mutaciones en el gen *TMPRSS3*. Nótese que los audiogramas presentan caída en frecuencias medias y agudas, signo característico de los pacientes con mutaciones en este gen.

En la familia S2055 segrega con la enfermedad la mutación c.2868_2872delGCCAG/ p.Q959Gfs*5 en el gen *MYO7A*, ya descrita en la literatura como causante de síndrome de Usher [Blanchet et al., 2007]. Los tres hermanos afectados de la familia son aún niños (edades

entre 2 y 8 años) y no han desarrollado retinosis pigmentaria. Será necesario realizar un seguimiento de la función visual de los pacientes en los próximos años.

La familia S2059 lleva dos mutaciones *missense* en el gen *CDH23*, c.901C>T/p.R301W y c.1996G>A/p.D666R, ambas no descritas y que segregan con la hipoacusia en la familia. Las mutaciones afectan a los dominios cadherina 3 y 6, respectivamente y los programas predictivos las consideran patogénicas (Tabla 23). Las hermanas afectas de la familia tienen 9 y 15 años. El audiograma parece indicar que se trata en este caso de HNSAR (DFNB12) y no de síndrome de Usher, puesto que la hipoacusia en pacientes con síndrome de Usher suele ser profunda y afectar a todas las frecuencias, y en este caso tan sólo tienen afectadas las frecuencias agudas (Figura 34). Las audiometrías de estos pacientes son muy similares a las que habíamos visto en la otra familia con hipoacusia DFNB12 identificada en este trabajo (véase sección 4.3, Figura 28).

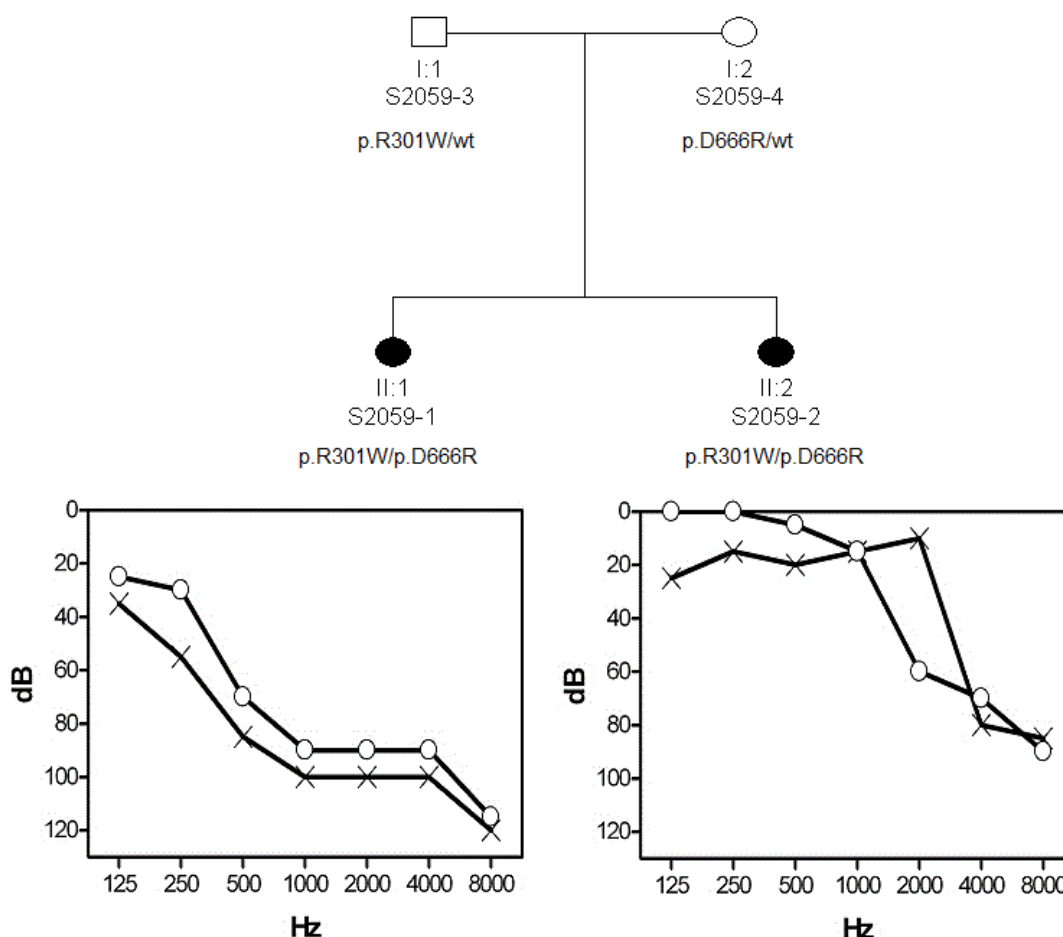


Figura 34. Árbol genealógico y audiogramas de los individuos afectados de la familia S2059 con mutaciones en el gen *CDH23*. Nótese que la hipoacusia no es profunda en todas las frecuencias, por lo que parece tratarse de un caso de HNSAR (DFNB12) y no de síndrome de Usher.

Finalmente, en la familia S2072 hemos identificado la mutación c.2657A>G/p.N886S en el gen *TECTA* (DFNB21). Se trata de un cambio *missense* previamente descrito [Hildebrand et al., 2011]. Este cambio también lo habíamos visto en nuestro laboratorio en otra familia española con HNSAR, en la que segregaba con una variante *frameshift*. El individuo afecto S2072-2, del que disponemos de datos audiológicos detallados, presenta un audiograma en forma de cubeta (mayor afectación en las frecuencias medias), característico de los pacientes con hipoacusia causada por mutaciones en *TECTA* (Figura 35).

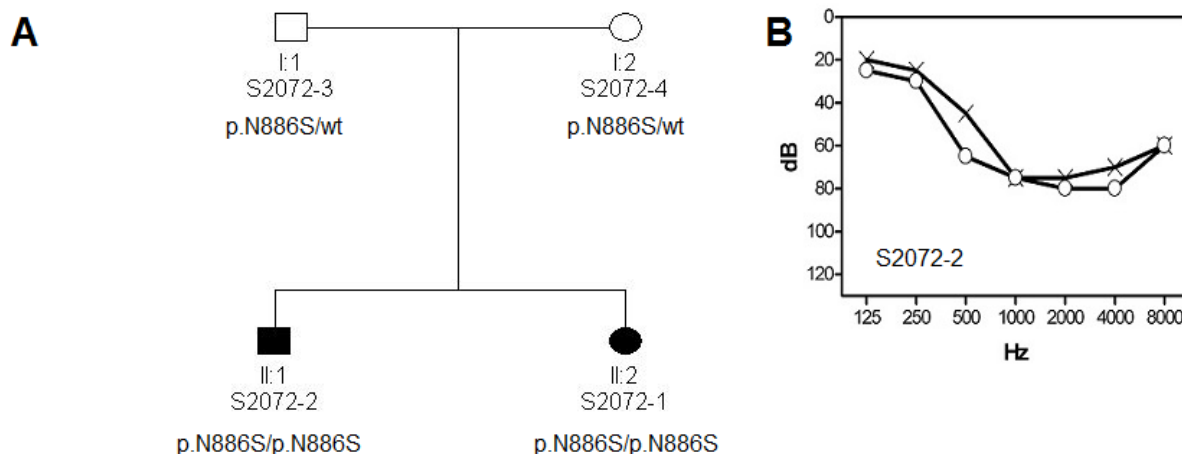


Figura 35. A. Árbol genealógico de la familia S2072 y segregación de la mutación p.N886S en *TECTA*. **B.** Audiograma del individuo afecto S2072-2, nótese que tiene la forma de cubeta característica de pacientes con mutaciones en este gen.

4.6. Secuenciación de exoma completo (WES)

Con el fin de identificar nuevos genes de HNSAR, secuenciamos los exomas completos de casos prefiltrados por otras metodologías.

Por una parte, seleccionamos 6 familias españolas no emparentadas en las que por análisis de haplotipos y secuenciación habíamos descartado 52 genes causantes de HNSAR (Figura 36). Por otra parte, seleccionamos 7 familias que no habían sido clarificadas por la secuenciación NGS del panel de genes de hipoacusias. De cada una de las 13 familias se seleccionaron dos o tres individuos afectados (según disponibilidad) para la secuenciación de exoma (Tabla 24).

Analizamos los resultados con la plataforma informática *Ingenuity*. En primer lugar descartamos las variantes con menos de 30 lecturas. El segundo filtro descartó variantes comunes. Debido a la baja prevalencia de las hipoacusias monogénicas en la población (se consideran enfermedades raras), eliminamos las variantes con una frecuencia poblacional igual o mayor al 1%. El siguiente filtro que aplicamos fue el de patogenicidad: seleccionamos

variantes de los sitios canónicos de *splicing*, variantes *missense* consideradas patogénicas al menos por un programa de predicción (*SIFT* o *Polyphen*), mutaciones *nonsense* y *frameshift*. Después aplicamos el filtro de análisis genético, de forma que seleccionamos las variantes en homocigosis o heterocigosis compuesta en el mismo gen que compartieran todos los hermanos afectados de la familia, y que no estuvieran presentes en un grupo de 12 individuos controles españoles (datos de exoma cedidos por el Dr. Francisco del Castillo). El último filtro es un filtro biológico que selecciona sólo las variantes en genes con implicación en el proceso de la audición o relacionados con ellos (Figura 37). En caso de que con este primer filtrado restrictivo no encontráramos las variantes causales, se relajaban cada uno de los filtros y se reanalizaban los resultados.

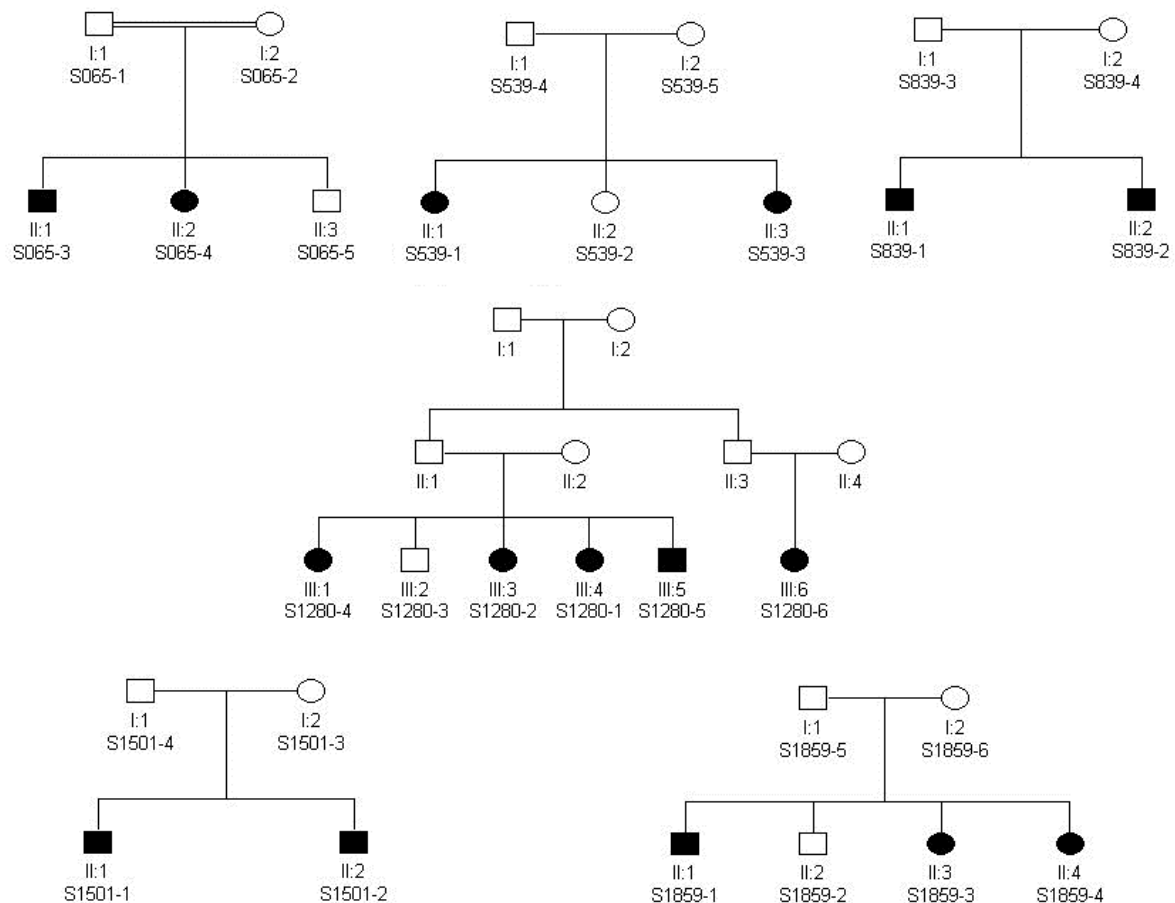


Figura 36. Árboles genealógicos de las familias cribadas para los 52 genes implicados en HNSAR. De estas familias se han elegido dos o tres individuos afectados para la secuenciación del exoma completo.

Tabla 24. Individuos a los que se les ha secuenciado el exoma completo.

Familia	Hermanos afectados secuenciados por exoma
S065	2 (S065-3 y 4)
S539	2 (S539-1 y 3)
S839	2 (S839-1 y 2)
S1280	3 (S1280-1, 2 y 4)
S1501	2 (S1501-1 y 2)
S1859	3 (S1859-1, 3 y 4)
S1974	3 (S1974-3, 4 y 6)
S1925	2 (S1925-1 y 3)
S1975	2 (S1975-1 y 2)
S2009	2 (S2009-1 y 2)
S2049	2 (S2049-1 y 2)
S2052	2 (S2052-1 y 2)
S2075	2 (S2075-1 y 2)
TOTAL EXOMAS	29

En todos los casos en los que identificamos variantes sospechosas de producir hipoacusia, se verificaron las mutaciones por secuenciación Sanger, y en caso de confirmarse, se investigó la segregación de la(s) variante(s) en la familia en estudio.

**Figura 37.** Ejemplo de filtrado de variantes de la familia S1925 con la plataforma Ingenuity.

4.6.1. Genes conocidos

En tres de las 13 familias analizadas, encontramos los dos alelos mutantes esperados en genes de HNSAR ya conocidos (Tabla 25).

Tabla 25. Familias elucidadas con mutaciones en genes de HNSAR conocidos.

Individuos	Gen	Tipo	Estado	Mutación
S1925-1 y 3	<i>TBC1D24</i>	Missense Missense	Heterocigosis Heterocigosis	c.119G>T/p.R40L ⁽¹⁾ c.641G>A/p.R214H ⁽²⁾
S2049-1 y 2	<i>STRC</i>	Nonsense Missense	Heterocigosis Heterocigosis	c.3823G>T/p.E1275* c.4559C>G/p.P1520R ⁽³⁾
S2052-1 y 2	<i>GPR98</i>	Frameshift	Homocigosis	c.1609_1616delTTATCCTT /p.L537Efs*9

Números de acceso: NM_001199107.1 *TBC1D24*, NM_153700.2 *STRC*, NM_032119.3 *GPR98*

⁽¹⁾[Campeau et al., 2014], ⁽²⁾[Bakhchane et al., 2015] y ⁽³⁾[Schrauwen et al., 2013]

En la familia S1925 identificamos mutaciones en el gen *TBC1D24*, cuya implicación en HNSAR fue publicada después del diseño de nuestro panel de hipoacusias. Las mutaciones en el gen *TBC1D24* producen varios síndromes epilépticos, síndrome DOORS (*Deafness*, *Onychodystrophy*, *Osteodystrophy*, *mental Retardation* and *Seizures*, hipoacusia, onicodistrofia, osteodistrofia, retraso mental y convulsiones) y HNS [Stražisar et al., 2015]. La variante c.119G>T/p.R40L fue descrita en homocigosis como causante de síndrome DOORS en una familia turca [Campeau et al., 2014], mientras que la variante c.641G>A/p.R214H ha sido descrita recientemente en varias familias de Marruecos con HNSAR [Bakhchane et al., 2015] (Figura 38). Las mutaciones segregan con la hipoacusia en la familia S1925. Los individuos afectados de esta familia fueron reinvestigados, confirmándose que no tenían ninguna discapacidad intelectual ni historial de trastornos epilépticos. Así mismo, el examen clínico descartó cualquier signo de onicodistrofia u osteodistrofia.

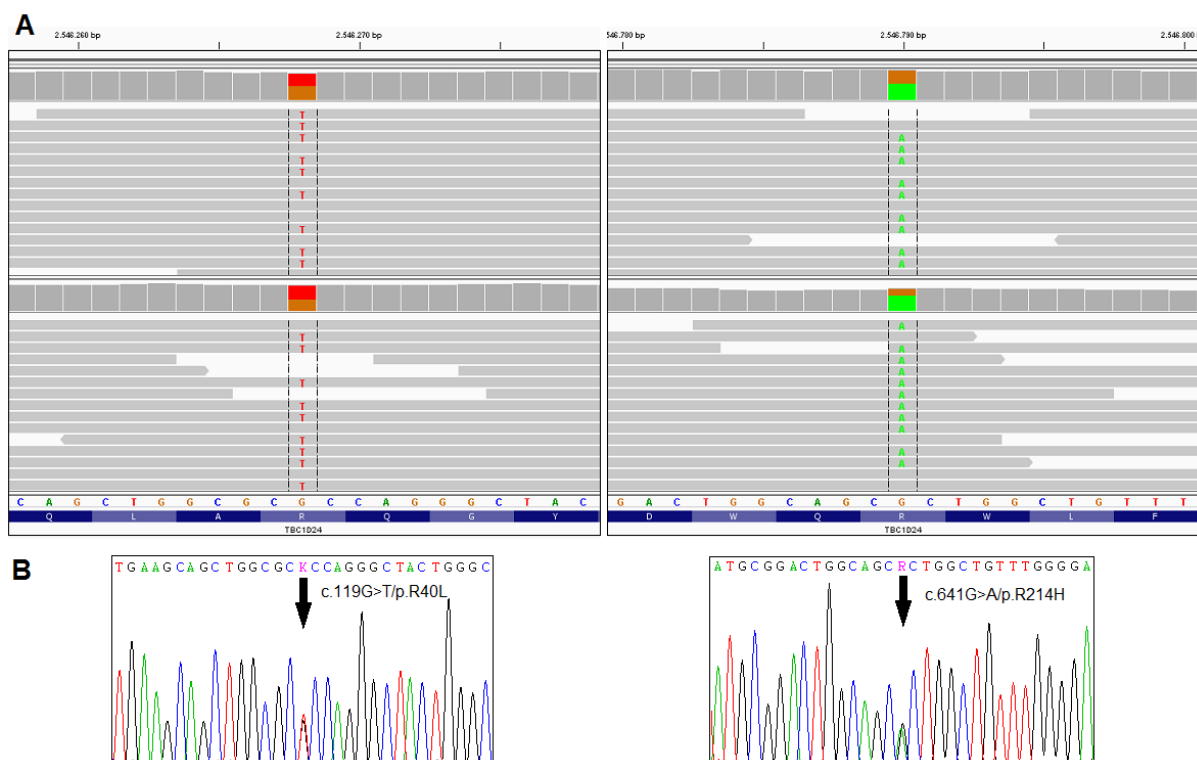


Figura 38. Mutaciones *c.119G>T/p.R40L* y *c.641G>A/p.R214H* en *TBC1D24* identificadas en heterocigosis compuesta en los individuos afectados de la familia S1925. **A.** Secuencias de exoma en el visor IGV. **B.** Secuencia obtenida por secuenciación Sanger.

En la familia S2049 se encontraron mutaciones en el gen *STRC* (DFNB16). Este gen tiene un pseudogén con muy alta identidad, lo que complica el análisis de su secuencia. Por ello no se incluyó en nuestro primer diseño del panel de hipoacusias. Las secuencias se pudieron realizar siguiendo un protocolo de PCR de largo recorrido, puesto a punto en nuestro laboratorio, en el que los cebadores se han posicionado en zonas de secuencia únicas (Tesis Doctoral de Laura Ruiz Palmero, Universidad Autónoma de Madrid, 2013 https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/11249/56160_ruiz_palmero_laura.pdf?sequence=1). En la familia S2049 segregan la mutación *nonsense* *c.3823G>T/p.E1275** y la *missense* *c.4559C>G/p.P1520R* (*SIFT*=0,03, *Polyphen*=0,57, *Consurf*=1) (Figura 39). El cambio *nonsense* no había sido descrito previamente en la literatura y el *missense* se había identificado en otra familia con hipoacusia en homocigosis en los afectados [Schrauwen et al., 2013]. La hipoacusia DFNB16 se caracteriza por ser leve-moderada [Francey et al., 2012]. En nuestros pacientes es leve en frecuencias agudas y moderada en frecuencias altas (Figura 39).

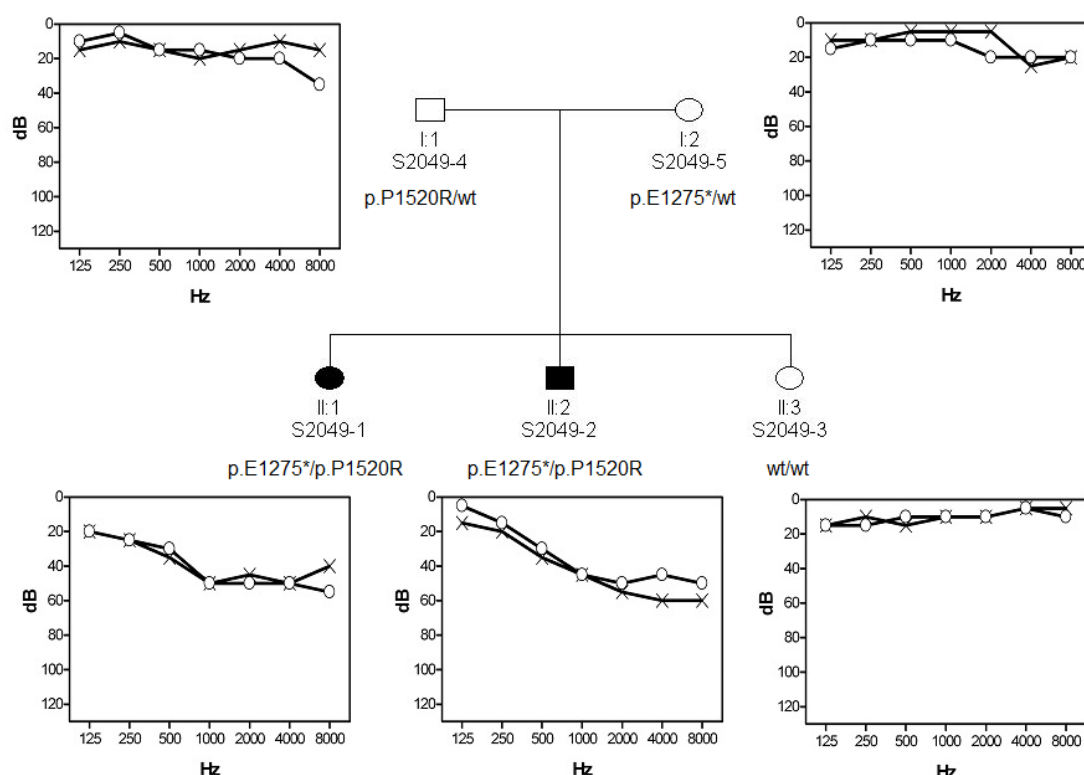


Figura 39. Árbol genealógico, segregación de mutaciones en el gen *STRC* y audiogramas de la familia S2049.

En la familia S2052 encontramos mutaciones en el gen *GPR98*. Las mutaciones en el gen *GPR98* producen síndrome de Usher tipo 2 (USH2C). Este gen no se había incluido en el panel por tratarse de una hipoacusia sindrómica, dar cuenta de pocos casos y por su gran tamaño. En la familia consanguínea S2052 segrega la mutación *frameshift* c.1609_1616delTTATCCTT/p.L537Efs*9, que no había sido descrita previamente (Figura 40). Las hermanas afectas de esta familia tienen 7 y 8 años y aún no han desarrollado la retinosis pigmentaria.

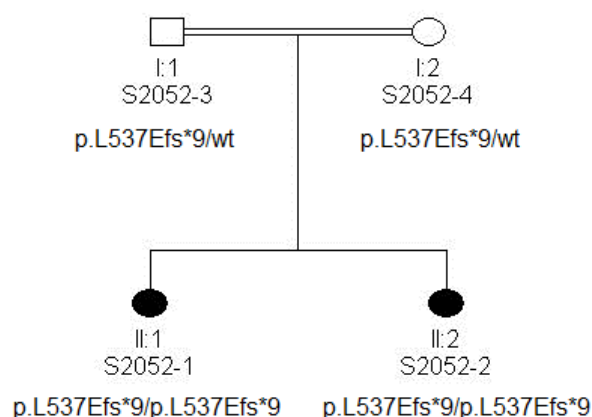


Figura 40. Árbol genealógico y segregación de mutaciones del gen *GPR98* en la familia consanguínea S2052.

4.6.2. Genes candidatos

En dos de las 13 familias analizadas, encontramos mutaciones que podrían explicar la hipoacusia en genes implicados en síndromes conocidos.

Tabla 26. Mutaciones identificadas en las familias S839 y S1975 tras secuenciación de exoma

Individuos	Gen	Tipo	Cambio	Estado
S839-1 y 2	GJB2	Missense	c.101T>C/p.M34T ⁽¹⁾	Heterocigosis
S839-1 y 2	TSPEAR	Frameshift	c.1178delC/p.P393Qfs*19	Heterocigosis
S839-1 y 2	GATA3	Missense	c.812C>T/p.S271L	Heterocigosis
S1975-1 y 2	SLITRK6	Missense	c.1196T>C/p.I399T	Homocigosis

Números de acceso: NM_004004.5 GJB2, NM_144991.2 TSPEAR, NM_001002295.1 GATA3, NM_032229.2 SLITRK6. ⁽¹⁾[Löppönen et al., 2012]

En la familia S1975 encontramos la mutación c.1196T>C/p.I399T en homocigosis en el gen *SLITRK6* (Figura 41). La mutación c.1196T>C/p.I399T segrega con la hipoacusia, los programas de predicción le dan el máximo valor de patogenicidad (*SIFT*=0, *Polyphen*=1, *Conseq*= 9) y su frecuencia poblacional es muy baja: en la base de datos *Exome Aggregation Consortium* (ExAc) en la que se han reunido exomas de 60.706 individuos, tiene una frecuencia alélica de 2/119.934 (aparece en 2 individuos en heterocigosis de un total de 60.000). Las mutaciones en el gen *SLITRK6* producen un síndrome que asocia hipoacusia con miopía magna (superior a -6.0 dioptrías) [Ordóñez and Tekin, 2015]. La reinvestigación de la familia mostró que la paciente S1975-2 tiene -9.0 dioptrías en un ojo y -10.0 en el otro, y la paciente S1975-1 tiene -7,0 dioptrías en uno de los ojos, pero visión normal en el otro.

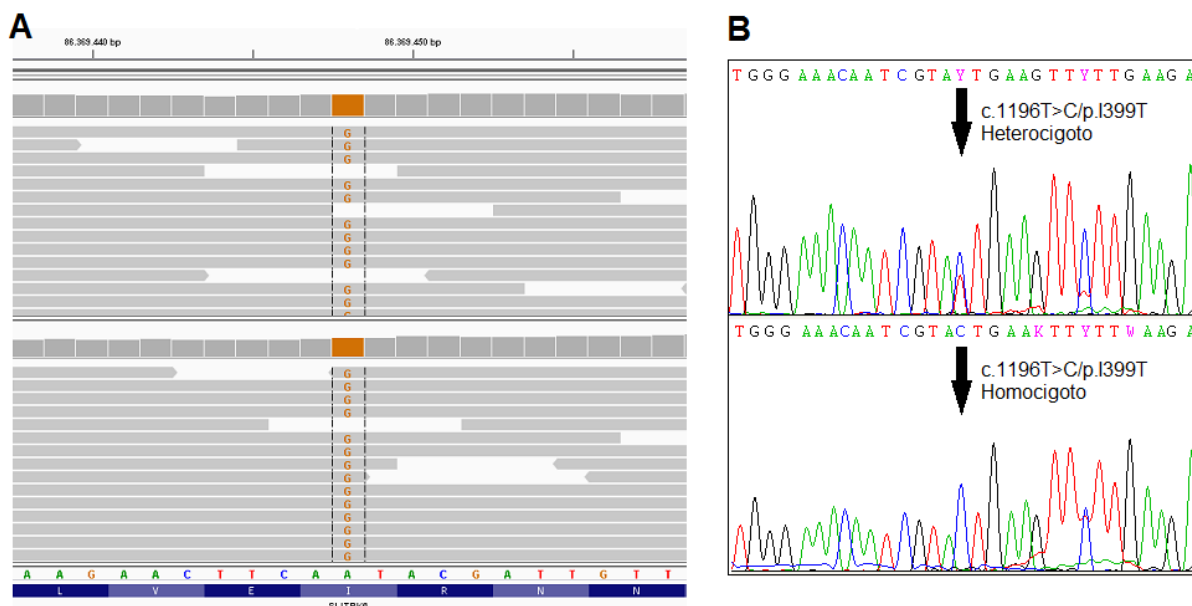


Figura 41. A. Visualización con el visor IGV de exoma de la mutación c.1196T>C/p.I399T identificada en homocigosis en los individuos S1975-1 y S1975-2 (respectivamente arriba y abajo) en el gen *SLITRK6*, nótese que se visualiza la hebra reversa y complementaria. **B.** Electroferogramas de la secuenciación Sanger de un individuo heterocigoto (madre) y un individuo afecto homocigoto (S1975-1) para el cambio.

En la familia S839 identificamos tres mutaciones potencialmente patogénicas en tres genes distintos, todas ellas en heterocigosis (Tabla 26). La variante identificada en el gen de *HNSAR TSPEAR* (DFNB98) es una mutación truncante no descrita, pero no se ha identificado una segunda mutación en dicho gen. La mutación en *GJB2* es un alelo hipomórfico con una frecuencia poblacional bastante alta, por lo que no es raro que los pacientes sean simples portadores de la misma. La tercera mutación se encontró en el gen *GATA3*, que codifica el regulador transcripcional del mismo nombre. Las mutaciones en el gen *GATA3* producen el síndrome HDR (*Hypoparathyroidism, Sensorineural Deafness and Renal Disease*, hipoparatiroidismo, sordera y enfermedad renal), de herencia autosómica dominante. Al investigar la segregación de la mutación en la familia S839 pudimos comprobar que los dos hijos afectados eran heterocigotos para el cambio y que ninguno de los dos progenitores sanos llevaba la mutación (de ahí la apariencia de herencia autosómica recesiva) (Figura 42). La paternidad está confirmada por el trabajo de haplotipado que hicimos para los 52 genes relacionados con *HNSAR* (unos 200 marcadores), por lo que parece tratarse de un caso de mosaicismo en la línea germinal. En el mismo amplicón donde se observa la mutación existe un polimorfismo intrónico en heterocigosis en la madre (c.929+34A>G, rs34909898). Este polimorfismo está presente en los dos hijos. Clonamos los dos alelos de uno de los hijos y comprobamos que el polimorfismo y la mutación se encuentran en *trans* (Figura 43). Esto sugiere que el mosaicismo de la línea germinal sería paterno. El cambio p.S271L no ha sido descrito en la literatura ni aparece en las bases de datos de 1000Genomas ni NHLBI ESP

(5400 exomas). Los programas informáticos de predicción de cambio de aminoácido le dan el máximo valor de patogenicidad (*Polyphen*=1, *SIFT*=0) y se trata de un residuo conservado (*Conseq*=7).

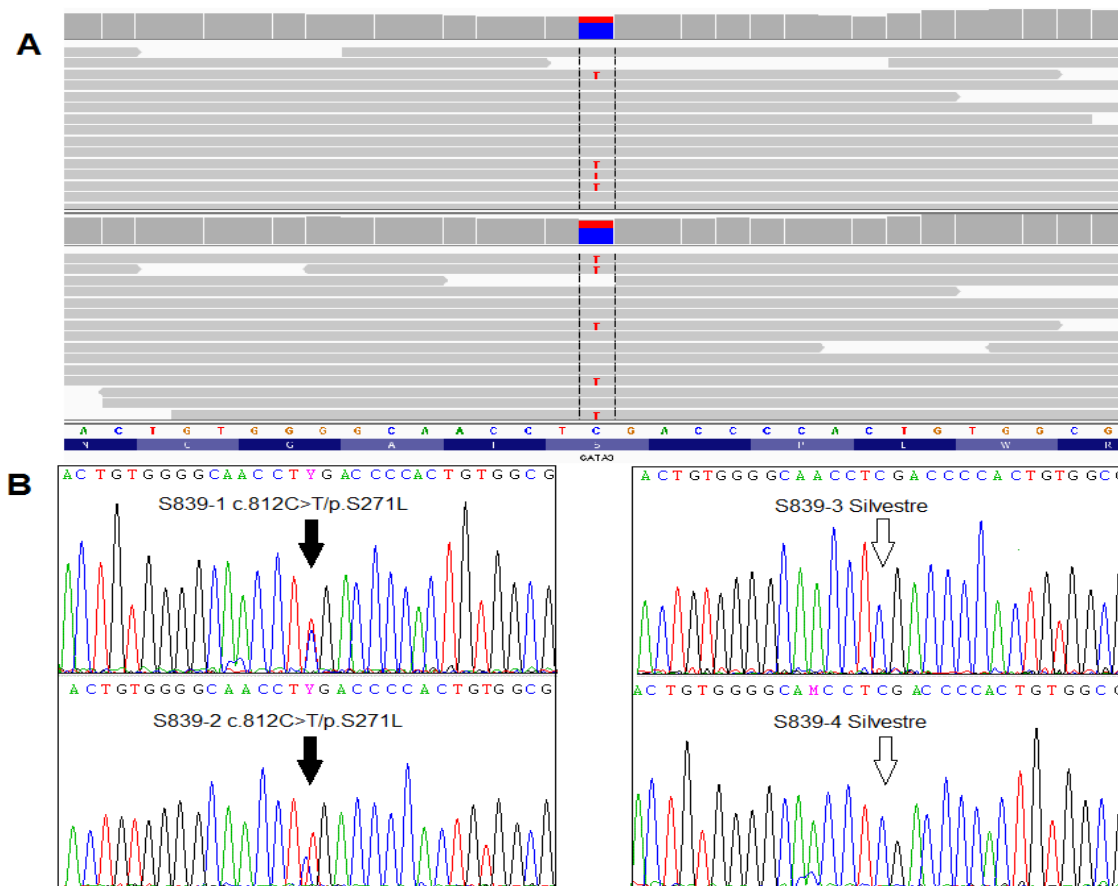


Figura 42. A. Se muestra la mutación identificada en GATA3 de los individuos S839-1 y 2 en el visor IGV de exoma. B. Electroferogramas de los cuatro individuos de la familia (secuenciación Sanger), nótese que los padres sanos (S839-3 y 4) no son portadores del cambio.

El cambio se encuentra dentro del dominio Zn1 (*zinc finger 1*) del factor de transcripción GATA3 (Figura 44). Hasta la fecha se han descrito 55 mutaciones en este gen causantes del síndrome HDR (base de datos HGMD <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), de ellas tan sólo 12 son de tipo *missense*, y de éstas, 5 afectan al dominio Zn1, otras 5 al Zn2 y 2 al extremo C-terminal (Tabla 27). Las mutaciones truncantes (*nonsense*, *frameshift*) se encuentran distribuidas de forma homogénea afectando a todas las regiones de la proteína y en el 90% de los casos provocan la pérdida del dominio Zn2. Las mutaciones que afectan al dominio Zn1 hacen que la proteína pierda afinidad por el ADN; las mutaciones en Zn2 impiden directamente la unión al ADN. La hipoacusia de los pacientes con mutaciones en el gen GATA3 suele ser moderada y afectar más a las frecuencias agudas. La hipoacusia de los

afectos de la familia S839 (Figura 43) es muy similar a la de otros pacientes con mutaciones en *GATA3* descritos (Figura 45).

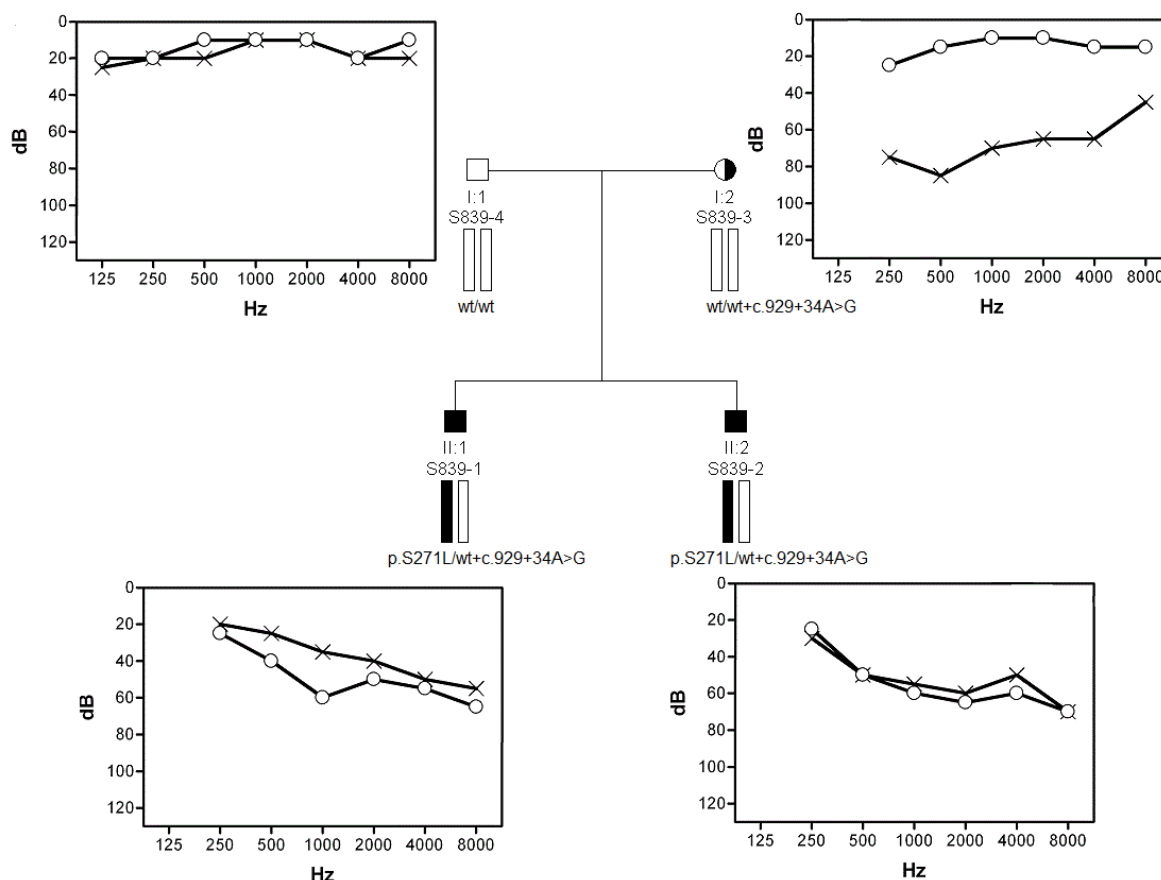


Figura 43. Árbol genealógico, segregación de cambios y audiogramas de la familia S839. Nótese que la madre tiene hipoacusia unilateral de causa desconocida. Las audiometrías de los hijos (afectos) indican una hipoacusia moderada con mayor afectación en las frecuencias agudas.

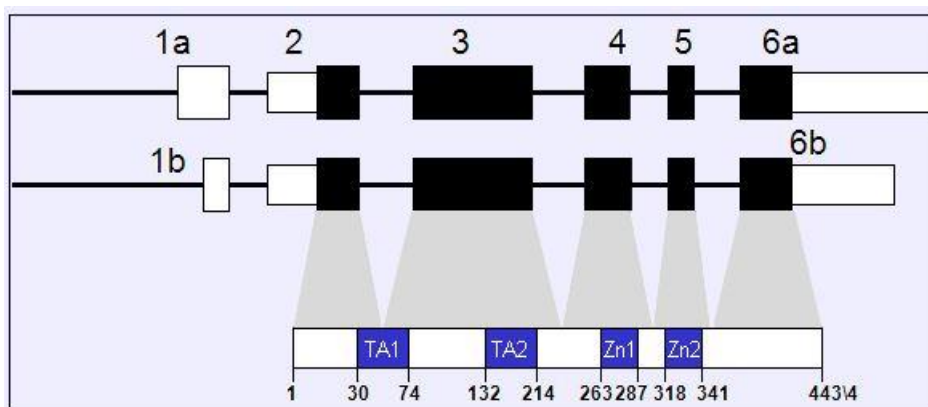


Figura 44. Representación de las dos isoformas del gen *GATA3* (de 443 y 444 aminoácidos). El gen tiene 6 exones. La proteína es un factor de transcripción que se une a la secuencia consenso A/T GATA A/G, cuenta con 2 dominios de transactivación (TA1 Y TA2) y 2 dominios de tipo zinc finger (Zn1 y Zn2). [Imagen de <http://atlasgeneticsoncology.org>].

Tabla 27. Mutaciones missense descritas en el gen GATA3.

Dominio	Cambio	Clínica	Descrita por
Límite Zn1	p.R262G	HDR	[Nakamura et al., 2011]
Zn1	p.S271L	D	Este trabajo
Zn1	p.T272I	HDR	[Gaynor et al., 2009]
Zn1	p.W275R	HDR	[Muroya et al., 2001]
Zn1	p.W275L	HDR	[Fukami et al., 2011]
Zn1	p.R276P	HDR	[Zahirieh et al., 2005]
Zn2	p.C318S	HDR	[Nakamura et al., 2011]
Zn2	p.C318R	HDR	[Nesbit et al., 2004]
Zn2	p.N320K	HDR	[Nesbit et al., 2004]
Zn2	p.C321S	HDR	[Ohta et al., 2011]
Límite Zn2	p.C342Y	HDR	[Moldovan et al., 2011]
Extremo carboxilo terminal	p.L348R	HDR	[Ali et al., 2007]
Extremo carboxilo terminal	p.R353S	HD	[Chiu et al., 2006]

H: indica Hipoparatiroidismo, D: hipoacusia (Deafness) y R: problemas Renales.

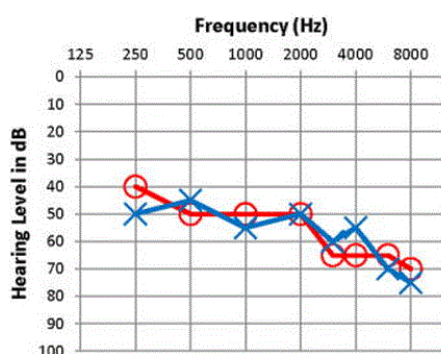


Figura 45. Audiometría de paciente con mutaciones en GATA3, se parece considerablemente a lo visto en nuestros pacientes (Figura 43). La hipoacusia de pacientes GATA3 es moderada-severa en rampa, con mayor afectación en frecuencias agudas [Chien et al., 2014]

4.6.3. Otros hallazgos

Hemos identificado variantes en otros genes de HNSAR, algunas claramente patogénicas, pero que al aparecer en heterocigosis sin segunda mutación asociada y/o no segregar con la hipoacusia en la familia no fueron consideradas la causa de la HNSAR, y

estos pacientes serían simplemente portadores (Tabla 28). Un ejemplo llamativo sería el de la familia S1501, en la que uno de los individuos afectados es portador de mutaciones en los genes *OTOF* (DFNB9) y *USH2A* (*síndrome Usher 2A*), pero no su hermano, también afectado. Esto puede explicarse porque su abuelo materno padece hipoacusia y su abuela materna tiene síndrome de Usher.

Tabla 28. Otras mutaciones potencialmente patogénicas identificadas mediante secuenciación de exoma.

Individuo	Gen	Tipo	Cambio	Estado
S539-1 y 3	<i>COL11A2</i>	<i>Missense</i>	c.1615C>T/p.R539W ⁽¹⁾	Heterocigosis
S1501-1 (no la lleva S1501-2)	<i>OTOF</i>	<i>Missense</i>	c.4558C>T/p.R1520W	Heterocigosis
S1501-1 (no la lleva S1501-2)	<i>USH2A</i>	<i>Frameshift</i>	c.2299delG/p.E767Sfs*21 ⁽²⁾	Heterocigosis
S1974-3 (no la llevan S1974-4 y 6)	<i>MYO7A</i>	<i>Missense</i>	c.2057G>A/p.R686H	Heterocigosis
S1974-3 y 6 (no la lleva S1974-4)	<i>PJVK</i>	<i>Promotor</i>	Duplicación 18 pb	Heterocigosis

Números de acceso: NM_080680.2 *COL11A2*, NM_194248.2 *OTOF*, NM_007123.5 *USH2A*, NM_000260.3 *MYO7A* y NM_001042702.3 *PJVK*. ⁽¹⁾rs145499142 MAF<0,01 bases de datos 1000Genomas y NHLBI Exome Project ⁽²⁾[Eudy et al. 1998].

4.7. Investigación de la expresión de los genes implicados en HNSAR en tejidos de fácil muestreo

El oído interno es un órgano del que no se pueden obtener muestras de pacientes vivos, de forma que no se puede disponer de ARNs mensajeros extraídos del oído de los pacientes con hipoacusia no sindrómica. Este impedimento dificulta el análisis de aquellas variantes de secuencia de las que se sospecha que pudieran afectar al *splicing*. Sin embargo, la expresión de los genes implicados en hipoacusias no sindrómicas no siempre está restringida al oído interno, si bien este terreno está poco explorado. En este trabajo hemos investigado la expresión de dichos genes en tejidos alternativos, fácilmente muestreables. Elegimos tres: sangre, orina y saliva, que se investigaron mediante secuenciación masiva del ARN (*RNAseq*), seguida de verificación por medio de RT-PCR.

4.7.1. RNAseq

En dos controles normoyentes (un varón y una mujer) realizamos *RNAseq* para los tres tejidos (sangre, orina y saliva). Esta es una herramienta muy útil tanto para cuantificar ARNs como para poder analizar los distintos transcritos y poder detectar mutaciones que afecten al procesamiento de los ARNs mensajeros.

Tabla 29. Resultados de *RNAseq* para los genes implicados en HNSAR. Los datos se han estandarizado, mayor número indica más expresión.

Gen	SANGRE Mujer/Varón	ORINA Mujer/Varón	SALIVA Mujer/Varón
ADCY1	4 / 0	3 / 0	21 / 0
BSND	1 / 0	22 / 8	0 / 0
CABP2	0 / 0	2 / 0	0 / 0
CDH23	1073 / 1084	68 / 228	10 / 1
CIB2	50 / 37	19 / 13	0 / 0
CLDN14	0 / 0	18 / 0	0 / 0
CLIC5	23 / 24	0 / 0	0 / 0
COL11A2	26 / 10	5 / 10	0 / 98
DCDC2	1 / 3	31 / 21	0 / 0
DFNB59	25 / 17	0 / 0	0 / 0
ELMOD3	769 / 875	96 / 34	1 / 0
EPS8	63 / 61	11 / 3	24 / 0
EPS8L2	133 / 213	5776 / 131	1 / 85
ESPN	37 / 77	331 / 94	0 / 0
ESRRB	2 / 5	43 / 26	14 / 47
FAM65B	27042 / 23937	771 / 4731	62 / 188
GIPC3	90 / 73	7 / 0	0 / 0
GJB2	1 / 0	524 / 72	0 / 2
GJB6	17 / 62	13 / 0	0 / 0
GPSM2	162 / 144	16 / 0	0 / 0
GRXCR1	0 / 0	0 / 0	0 / 0
GRXCR2	0 / 0	0 / 0	0 / 0
HGF	121 / 136	8 / 0	0 / 0
ILDR1	10 / 31	21 / 3	0 / 0
KARS	5146 / 5407	707 / 299	1 / 2
LOXHD1	59 / 57	3 / 5	22 / 0
LRTOMT	142 / 138	135 / 27	0 / 0
MARVELD2	6 / 9	50 / 17	25 / 0
MET	1 / 2	124 / 27	12 / 0
MSRB3	119 / 146	9 / 17	0 / 1
MYO15A	17 / 23	13 / 0	0 / 0
MYO3A	1 / 0	3 / 0	0 / 0
MYO6	72 / 102	1302 / 48	2 / 0

Gen	SANGRE Mujer/Varón	ORINA Mujer/Varón	SALIVA Mujer/Varón
<i>MYO7A</i>	81 / 131	12 / 3	0 / 0
<i>NARS2</i>	305 / 294	4 / 8	0 / 0
<i>OTOA</i>	6 / 5	12 / 0	0 / 28
<i>OTOF</i>	14 / 16	16 / 10	0 / 0
<i>OTOG</i>	0 / 0	17 / 0	0 / 0
<i>OTOGL</i>	1 / 0	22 / 0	8 / 0
<i>PCDH15</i>	0 / 2	11 / 0	0 / 0
<i>PDZD7</i>	0 / 0	0 / 0	0 / 0
<i>PNPT1</i>	407 / 346	43 / 12	1 / 0
<i>PTPRQ</i>	0 / 0	8 / 0	0 / 0
<i>RDX</i>	328 / 330	47 / 14	2 / 140
<i>SERPINB6</i>	2517 / 2760	1899 / 495	0 / 160
<i>SLC26A4</i>	0 / 5	95 / 5	0 / 0
<i>SLC26A5</i>	4 / 1	0 / 0	58 / 0
<i>STRC</i>	24 / 28	11 / 0	0 / 0
<i>SYNE4</i>	22 / 14	64 / 46	0 / 0
<i>TBC1D24</i>	205 / 229	68 / 13	0 / 0
<i>TECTA</i>	15 / 16	10 / 7	0 / 0
<i>TMC1</i>	0 / 1	38 / 0	28 / 0
<i>TMEM132E</i>	11 / 12	8 / 13	0 / 0
<i>TMHS</i>	0 / 1	0 / 0	0 / 0
<i>TMIE</i>	40 / 38	54 / 0	0 / 0
<i>TMPRSS3</i>	30 / 59	18 / 3	18 / 0
<i>TPRN</i>	231 / 289	258 / 50	0 / 0
<i>TRIOBP</i>	3045 / 3599	692 / 476	27 / 49
<i>TSPEAR</i>	28 / 23	12 / 0	0 / 0
<i>USH1C</i>	0 / 0	253 / 92	0 / 0
<i>WHRN</i>	110 / 151	23 / 13	0 / 81

Hemos centrado nuestros análisis en los datos de expresión obtenidos de los genes de interés, es decir, genes implicados en HNSAR (Tabla 29). La mayor expresión se ha obtenido en general en las muestras de sangre, seguidas de las muestras de orina, mientras que los resultados de saliva indican que la mayoría de los genes de HNSAR no se expresan en este tejido. En una serie de ejemplos (genes *BSND*, *CLDN14*, *DCDC2*, etc) el único tejido en que se ha registrado expresión es la orina. Por otra parte, comparando los dos individuos, las mayores diferencias se encuentran en orina, obteniendo del varón resultados de expresión más bajos en general. Esto pudiera tener relación con la renovación del epitelio de la vejiga (el ARN de orina procede de este tejido), ya que hay más renovación en mujeres que en varones.

4.7.2. RT- PCR

Seleccionamos 5 individuos normoyentes (2 varones y 3 mujeres) y se les extrajo ARN de sangre, saliva y orina (dos de los cinco controles son los individuos del apartado anterior). Se retrotranscribió el ARN total y después hicimos una PCR para cada gen sobre los ADNc. En el transcurso de este trabajo, pudimos investigar la expresión de 25 genes, priorizando aquellos con mayor frecuencia de mutaciones en nuestro estudio epidemiológico.

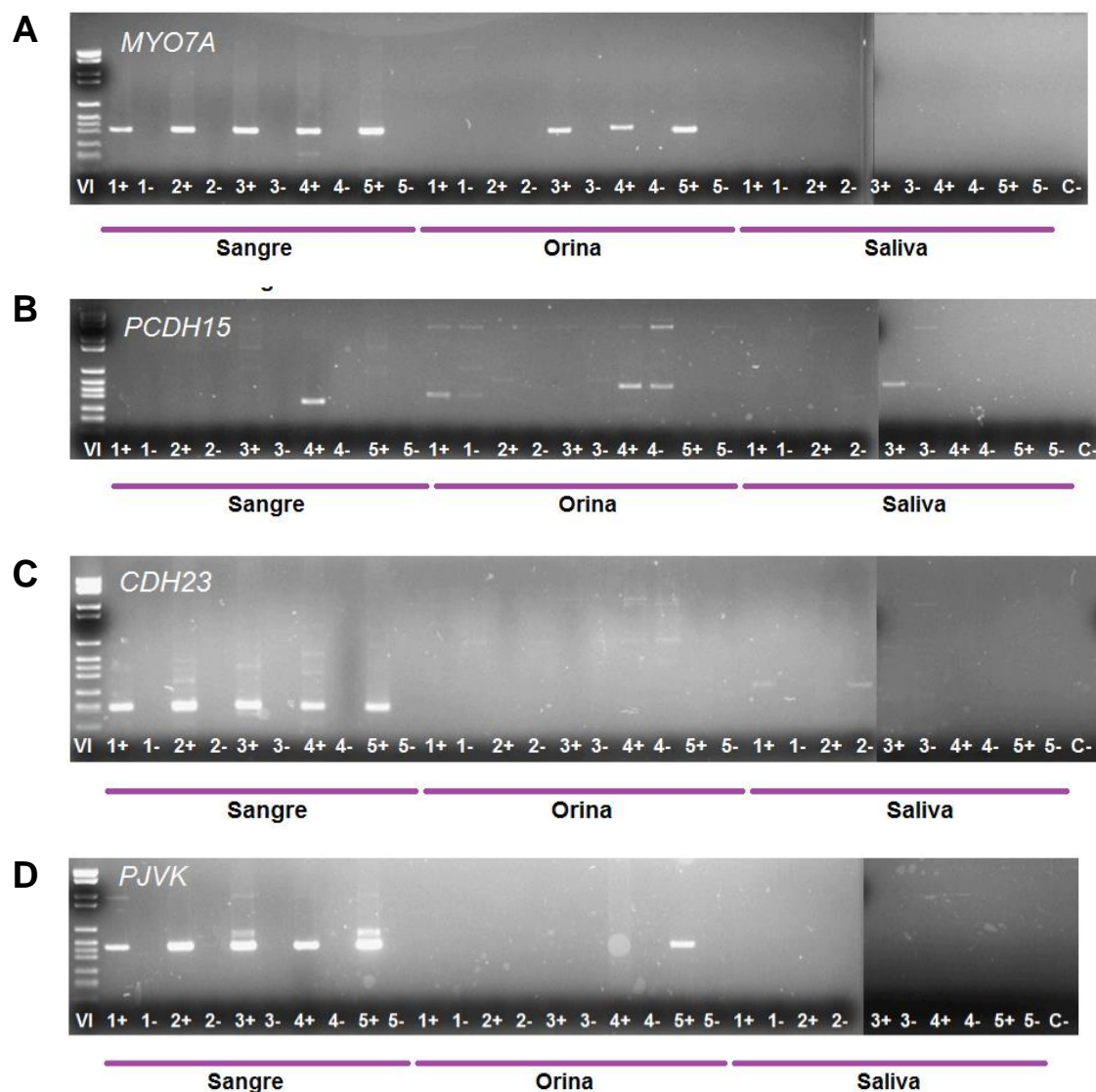


Figura 46. Expresión de los cuatro genes investigados en esta tesis en sangre, orina y saliva. Las muestras de los dos varones corresponden a las 1 y 2 y las muestras de las tres mujeres a las 3, 4 y 5. Para cada individuo se carga RT+ y RT- (la muestra RT- ha seguido el mismo proceso que la RT+ sin retrotranscriptasa, por lo que es un control de amplificación de ADN genómico residual). El último pocillo no lleva ADN, es un control de amplificación negativo. **A.** MYO7A se expresa en los 5 individuos controles en sangre y en orina sólo en los controles femeninos, no se expresa en saliva. **B.** PCDH15 sólo se expresa en uno de los controles (4) en sangre. Los otros amplificados son ADNg. **C.** CDH23 se expresa en los 5 individuos controles en sangre, no se expresa en orina ni saliva. **D.** PJKV se expresa en los 5 individuos controles en sangre, y sólo en un control femenino en orina, en saliva no se expresa.

Se muestran los ejemplos de las PCRs correspondientes a los genes específicamente estudiados en esta tesis (Figura 46). Podemos concluir que *MYO7A* se expresa en sangre, y debe ser de forma consistente puesto que la PCR ha funcionado en los 5 individuos testados. También ha funcionado la PCR en orina, pero sólo en los controles femeninos. *PCDH15* no parece expresarse en cantidad suficiente en ninguno de los tejidos testados, ya que sólo hemos conseguido amplificar la muestra de un control en sangre. *CDH23* se expresa correctamente en sangre, y no se expresa en los otros dos tejidos. *PJVK* se expresa también en sangre en todas las muestras pero solamente en una muestra en orina.

4.7.3. RNAseq versus RT- PCR

En esta tabla se muestran los resultados obtenidos para una batería de genes con ambas metodologías (Tabla 30).

Tabla 30. Se muestran los resultados de RNAseq versus la prueba de amplificación RT-PCR.

Gen	SANGRE		ORINA		SALIVA	
	Mujer/Varón RNAseq	Mujer/Varón RT-PCR	Mujer/Varón RNAseq	Mujer/Varón RT-PCR	Mujer/Varón RNAseq	Mujer/Varón RT-PCR
<i>CDH23</i>	1073 / 1084	Sí / Sí	68 / 228	No / No	10 / 1	No / No
<i>CLRN1</i>	3 / 2	No / No	0 / 0	No / No	0 / 0	Sí / No
<i>COL11A2</i>	26 / 10	Sí / Sí	5 / 10	No / No	0 / 98	No / No
<i>ESPN</i>	37 / 77	Sí / Sí	331 / 94	Sí / No	0 / 0	No / No
<i>GJB6</i>	17 / 62	Sí / Sí	13 / 0	Sí / No	0 / 0	No / No
<i>GPR98</i>	10 / 4	Sí / Sí	33 / 2	Sí / No	8 / 23	No / No
<i>LOXHD1</i>	59 / 57	Sí / Sí	3 / 5	No / No	22 / 0	No / No
<i>MYO15A</i>	17 / 23	Sí / No	13 / 0	No / No	0 / 0	No / No
<i>MYO3A</i>	1 / 0	Sí / Sí	3 / 0	No / No	0 / 0	No / No
<i>MYO6</i>	72 / 102	Sí / Sí	1302 / 48	Sí / No	2 / 0	No / No
<i>MYO7A</i>	81 / 131	Sí / Sí	12 / 3	Sí / No	0 / 0	No / No
<i>OTOA</i>	6 / 5	Sí / Sí	12 / 0	Sí / No	0 / 28	No / No
<i>OTOF</i>	14 / 16	Sí / Sí	16 / 10	No / No	0 / 0	No / No
<i>PCDH15</i>	0 / 2	No / No	11 / 0	No / No	0 / 0	No / No
<i>PJVK</i>	25 / 17	Sí / Sí	0 / 0	No / No	0 / 0	No / No
<i>SANS</i>	0 / 0	No / No	2 / 0	No / No	5 / 0	No / No
<i>SLC26A4</i>	0 / 5	Sí / Sí	95 / 5	Sí / No	0 / 0	No / No
<i>SLC26A5</i>	4 / 1	Sí / Sí	0 / 0	No / No	58 / 0	No / No
<i>TECTA</i>	15 / 16	Sí / Sí	10 / 7	No / No	0 / 0	No / No
<i>TMC1</i>	0 / 1	No / Sí	38 / 0	Sí / No	28 / 0	No / No
<i>TMPRSS3</i>	30 / 59	Sí / Sí	18 / 3	No / No	18 / 0	No / No
<i>TRIOBP</i>	3045 / 3599	Sí / Sí	692 / 476	Sí / No	27 / 49	No / No
<i>USH1C</i>	0 / 0	No / No	253 / 92	Sí / No	0 / 0	No / No
<i>USH2A</i>	0 / 0	No / No	26 / 0	No / No	88 / 0	No / No
<i>WHRN</i>	110 / 151	Sí / Sí	23 / 13	No / No	0 / 81	No / No

En general, los resultados obtenidos entre ellas concuerdan. En los casos en que no es así, hay que tener en cuenta que cuando lo que se detecta es una muy baja expresión residual puede haber diferencias entre los resultados de la RT-PCR en días diferentes.

Como conclusión, cabe destacar que, la sangre ha sido el tejido con mejor expresión, la saliva el de peor (prácticamente no ha funcionado en ningún caso), y la orina ha tenido una expresión intermedia.

5. DISCUSIÓN

5.1. Epidemiología genética de la HNSAR en la población española

En este trabajo, el cribado de cuatro genes implicados en HNSAR (*MYO7A*, *PCDH15*, *CDH23*, *PJVK*) nos ha permitido encontrar las mutaciones causantes de la hipoacusia en 7 casos familiares, que proceden de una cohorte inicial de 140 familias. Agrupando los resultados de este trabajo con los obtenidos por nuestro laboratorio en estudios precedentes, disponemos ya de datos sobre 52 de los 61 genes cuya implicación en HNSAR es actualmente conocida (los 9 genes restantes han sido identificados muy recientemente y su análisis se encuentra en curso). De este modo, es ya posible presentar una visión bastante general de las contribuciones de los diferentes genes a las HNSAR en la población española.

De las 140 familias estudiadas, se han podido elucidar 104 (74,3%) (Figura 47). La mayor contribución corresponde, como cabía esperar por similitud con otras poblaciones del sur de Europa, al locus DFNB1 (genes *GJB2* y *GJB6*) con 63 casos (45%). Otros dos genes con contribuciones relevantes son *OTOF* (6% de los casos) y *MYO15A* (5%). Les siguen un pequeño grupo de genes con contribuciones entre el 2% y el 3%: *SLC26A4*, *STRC* y *TMC1*. Otros 11 genes más contribuyen alrededor del 1% cada uno, entre ellos los cuatro estudiados en este trabajo (Figura 47). En los 34 genes restantes, una amplia mayoría, no hemos encontrado mutaciones en nuestra cohorte, por lo que se espera que tengan una contribución muy escasa. Significativamente, un 26% de las familias de nuestra cohorte sigue sin elucidar después de haber cribado 52 genes, lo que sugiere que numerosos genes implicados en HNSAR están aún pendientes de identificar. Cabe esperar que la contribución de cada uno de esos hipotéticos nuevos genes sea también muy escasa, lo que da idea de la enorme heterogeneidad genética de las HNSAR.

La epidemiología genética de las HNSAR no ha sido aún suficientemente estudiada en la mayoría de las poblaciones, de forma que se dispone solamente de datos muy fragmentarios. No obstante, los datos disponibles muestran claramente que la epidemiología genética de HNSAR difiere bastante entre poblaciones, tanto en lo que se refiere a la frecuencia de las mutaciones en cada gen, como en cuanto al espectro mutacional. Los genes más estudiados han sido los del locus DFNB1 (*GJB2* y *GJB6*), por su elevada contribución al conjunto de las HNSAR, que ha tenido como consecuencia la generalización de su cribado en los laboratorios que prestan diagnóstico genético de HNSAR.

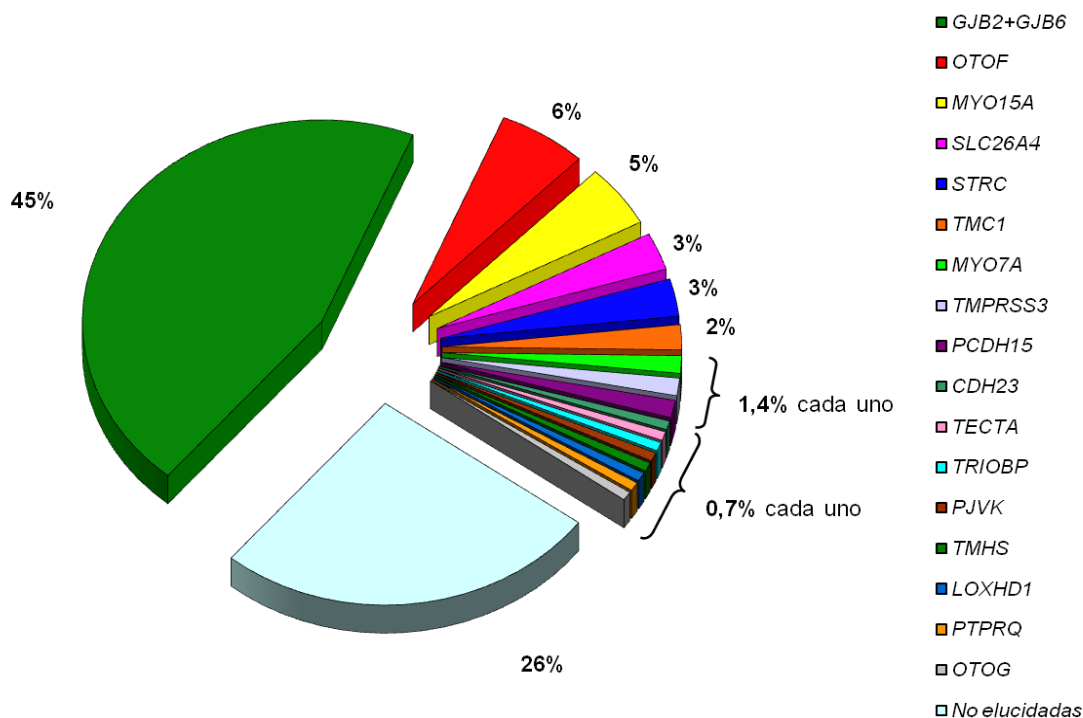


Figura 47. Representación de la contribución de cada uno de los genes relacionados con HNSAR en una cohorte de 140 casos familiares españoles.

Las mutaciones en el locus DFNB1 son muy frecuentes en poblaciones europeas, en Oriente Medio y en Argentina (20-50 % de los casos de HNSAR). Sin dejar de ser las más frecuentes, la contribución de estas mutaciones es algo menor en Estados Unidos, Brasil, India, Irán, Asia Oriental y Australia (10-20 %). En Pakistán y Mongolia rondan el 5 %, son muy infrecuentes en Indonesia y parecen estar ausentes de la población de Omán [del Castillo and del Castillo, 2011] [Chan y Chang, 2014].

La elevada heterogeneidad genética de las HNSAR, que volvía imposible la prestación de un diagnóstico genético extendido a todos los genes conocidos mediante secuenciación de tipo Sanger, ha tenido como consecuencia que existan pocos estudios completos de epidemiología genética de las HNSAR. Los más relevantes son los siguientes:

- **Reino Unido:** en un estudio de 26 genes de HNSAR en 142 familias se obtuvieron las siguientes frecuencias: *GJB2* (33,1%), *SLC26A4* (3,5%), *OTOF* (1,4%), *TMPRSS3* (0,7%) y *TECTA* (0,7%) [Hutchin et al., 2005].
- **Turquía:** se analizaron 60 familias para 38 genes de HNSAR, con los siguientes resultados: *GJB2* (18,9%), *MYO15A* (9,9%), *TMIE* (6,6%), *TMC1* (6,6%), *OTOF* (5%), *CDH23* (3,3%), *MYO7A* (3,3%), *SLC26A4* (1,7%), *PCDH15* (1,7%), *LRTOMT* (1,7%), *SERPINB6* (1,7%) y *TMPRSS3* (1,7%) [Duman et al., 2011].
- **Pakistán:** diversos estudios realizados sobre una cohorte de más de 500 familias indican que los genes con mayor contribución son: *SLC26A4* (7%), *GJB2* (6%), *MYO7A* (5%),

MYO15A (3%), *CDH23*, *TMPRSS3*, *TMC1* y *TRIOBP* (cada uno de estos cuatro genes con contribuciones entre el 1% y el 2%) [Yan et al., 2015].

- **Japón:** en un estudio de 600 familias con HNSAR, se obtuvieron los siguientes resultados: *GJB2* (16%), *SLC26A4* (9%), *CDH23* (4%), *MYO15A*, *COL11A2*, *MYO7A* y *OTOF* (cada uno de estos cuatro genes con contribuciones entre el 1% y el 2%) [Nishio and Usami, 2015].

El establecimiento de comparaciones entre los datos procedentes de los cribados en diferentes poblaciones se ve dificultado por las numerosas diferencias que se observan en las cohortes estudiadas y en los cribados realizados. Las cohortes investigadas no son homogéneas en cuanto al número de individuos estudiados, la edad de los mismos, la representación de los diferentes grados de pérdida auditiva en cada cohorte, la proporción de hipoacusias prelocutivas y postlocutivas, y la proporción de casos familiares y esporádicos. Los cribados difieren en el número de genes investigados y en la aproximación metodológica, ya que pueden abarcar solamente la región codificante o también regiones reguladoras, y pueden incluir o no detección de variantes de número de copias (CNVs). Estudios recientes hacen sospechar que la contribución de estas últimas puede ser más elevada de lo que comúnmente se piensa [Shearer et al., 2014]. Por otra parte, no todos los estudios coinciden en la atribución de patogenicidad a una misma variante de secuencia.

A pesar de todas estas dificultades, los datos disponibles sí que permiten extraer algunas conclusiones. Detrás de los genes comúnmente mayoritarios (*GJB2* y *GJB6*), los genes con mayores contribuciones en la población española (*OTOF*, *MYO15A*, *SLC26A4*, *TMPRSS3*, *TMC1*, *MYO7A*, *CDH23*, *PCDH15* y *TECTA*), tres de ellos investigados en este trabajo, figuran también entre los más frecuentemente afectados en las otras poblaciones hasta ahora estudiadas. La excepción del gen *STRC* se explica por la mayor propensión del mismo a sufrir delecciones (tiene en su proximidad un pseudogén no funcional con el que recombina) [Francey et al., 2012] [Vona et al., 2015] y, como ya hemos dicho, la mayoría de los cribados no incluyen detección de CNVs. Entre esta decena de genes, las diferentes frecuencias entre poblaciones pueden atribuirse en parte a la existencia de efectos fundadores para mutaciones concretas, que elevan la contribución del gen en esa población. Esto ocurre con la mutación p.Q829* del gen *OTOF* en la población española, lo que explica la mayor contribución de este gen en relación a otras poblaciones.

Por lo que respecta a los espectros mutacionales, las diferencias entre poblaciones vienen condicionadas por el elevado número de genes implicados y la baja contribución de cada uno, de forma que en muchos genes de HNSAR solamente se han descrito entre una y

cinco mutaciones. En este trabajo hemos identificado 28 mutaciones patogénicas, 18 de ellas no descritas previamente. Estos resultados concuerdan con el hecho conocido de que la mayoría de las mutaciones que se identifican en pacientes en los que previamente se han excluido mutaciones en el locus DFNB1 son nuevas y, probablemente, privadas (solamente se observan en una familia y no se vuelven a detectar en ninguna más). Esta distribución tiene consecuencias para las estrategias de diagnóstico genético, como luego comentaremos.

El estudio completado con los genes investigados en este trabajo es el primer estudio de epidemiología genética de la HNSAR en población española y el más amplio realizado en cualquier población europea hasta la fecha. La metodología clásica empleada (análisis de haplotipos seguido de secuenciación Sanger en los casos en los que el ligamiento genético no se pudo excluir) ha sido extraordinariamente laboriosa y, necesariamente, restringe el estudio a casos familiares aptos para proporcionar información en los análisis de haplotipos. Las nuevas metodologías de secuenciación masiva posibilitan técnicamente cribados extensos de casos familiares y esporádicos, sin selección previa por estructura familiar, que además están empezando a incorporarse a las rutinas diagnósticas. A medida que estas metodologías abaraten sus costos, podremos disponer de datos para ir componiendo cuadros más completos y fiables sobre la epidemiología genética de las HNSAR en las diferentes poblaciones.

5.2. Correlaciones genotipo-fenotipo

5.2.1. HNSAR y síndrome de Usher

En este trabajo, las familias incluidas en el estudio epidemiológico clásico y las que se investigaron mediante secuenciación masiva (panel de genes de hipoacusias y exomas completos) fueron seleccionadas por contar con un diagnóstico clínico de hipoacusia no sindrómica, sin signos clínicos aparentes en otros órganos. Sin embargo, en cinco de las familias que pudimos elucidar se han observado con posterioridad los signos clínicos característicos de síndromes conocidos.

Cuatro de estas cinco familias corresponden al síndrome de Usher: S202 (mutaciones en *MYO7A*), S1222 y S1430 (mutaciones en *PCDH15*) y S913 (mutaciones en *CDH23*). En los afectados de todas estas familias, la retinosis pigmentaria se manifestó años después del ingreso del caso en nuestra colección de HNSAR.

Se han descrito unas 260 mutaciones en el gen *MYO7A* que son causantes de síndrome de Usher (<http://www.umd.be/>). Se trata de grandes reordenamientos, mutaciones *missense*, *frameshift*, *nonsense* y de *splicing*. En cambio existen pocas

mutaciones descritas en este gen relacionadas con hipoacusia DFNB2 [Riazuddin et al., 2008] [Hildebrand et al., 2010]. De hecho, se había llegado a sospechar que las mutaciones en el gen *MYO7A* sólo producían síndrome de Usher y los casos que se habían descrito en la literatura de DFNB2 eran familias en las que la RP aún no se había manifestado [Astuto et al., 2002a]. Se piensa que las mutaciones truncantes y las mutaciones *missense* que afectan a los dominios funcionales de la proteína producirían síndrome de Usher. Por el contrario, las mutaciones de naturaleza más leve (inserciones o deleciones en fase, o mutaciones *missense* que no afectan a los dominios funcionales de la proteína) serían responsables de HNSAR [Rong et al., 2014], aunque existen pocos casos de DFNB2 que sustenten esta correlación. Las mutaciones que hemos identificado en la familia S202 afectan a dominios MyTH4, por lo que encajan dentro de la correlación propuesta.

En el gen *PCDH15* se han descrito unas 70 mutaciones causantes de síndrome de Usher y 20 causantes de HNSAR. Por su parte, en *CDH23* se conocen unas 160 mutaciones causantes de síndrome de Usher y 80 de HNSAR. A partir de estos datos, para ambos genes se proponen correlaciones similares a la enunciada para el gen *MYO7A*. Las mutaciones encontradas en las familias S1222 y S1430 (*PCDH15*) y S913 (*CDH23*) son todas truncantes, por lo que, dado el fenotipo de síndrome de Usher, encajan también dentro de las correlaciones postuladas.

A los cuatro casos familiares que hemos discutido hay que añadir la familia S1157 (dos mutaciones en *MYO7A*: una *missense* que afecta a un dominio funcional y una deleción de 38 aminoácidos en el dominio motor), la familia S2055 (una mutación *frameshift* en *MYO7A* en homocigosis), la familia iraní 207 (una mutación *frameshift* en *PCDH15* en homocigosis) y la familia S2052 (una mutación *frameshift* en *GPR98* en homocigosis). La naturaleza de las mutaciones encontradas indica, si nos atenemos a las correlaciones antes mencionadas, que los individuos afectados de estas familias podrían tener síndrome de Usher. Esto no se ha podido comprobar en los casos de la familia iraní 207 y de la familia española S1157, con las que se ha perdido el contacto. En los casos de las familias S2055 y S2052, los afectados tienen edades todavía por debajo de las edades de manifestación características de los síndromes de Usher de tipos 1 y 2, respectivamente.

Por el contrario, hemos encontrado dos casos que sí podrían ser auténticos casos de HNSAR: el caso esporádico E732, que lleva una mutación *missense* previamente descrita como causante de hipoacusia DFNB12 [Brownstein et al. 2011] y una duplicación en fase de un aminoácido, ambas mutaciones leves; y el caso familiar S2059, heterocigoto compuesto para dos mutaciones *missense*. Aunque los individuos afectos de estos dos casos aún no tienen suficiente edad para descartar (o considerar muy poco probable) una

manifestación posterior de la RP, el nivel de la pérdida auditiva y el perfil del audiograma de estos pacientes concuerdan con lo esperado para una HNSAR de tipo DFNB12.

5.2.2. HNSAR y síndrome de Pendred

La quinta familia con un diagnóstico inicial de HNSAR en la que luego se encontraron signos clínicos adicionales corresponde a un síndrome de Pendred (mutación truncante de *SLC26A4* en homocigosis). El hipotiroidismo característico del síndrome de Pendred puede pasar desapercibido y ser revelado sólo tras una reinvestigación cuidadosa del paciente.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las colecciones de pacientes con HNSAR están inevitablemente contaminadas con casos sindrómicos, bien sea porque los signos clínicos adicionales no se han manifestado aún a la edad en que el caso es incorporado al estudio, bien porque el examen clínico previo no haya podido detectar signos clínicos sutiles o que requieren análisis específicos. Es razonable proponer que, cuando la manifestación de los signos sindrómicos sea tardía, esos casos no sean retirados del balance epidemiológico de HNSAR, ya que a todos los efectos son casos no sindrómicos hasta que se alcanza la edad crítica.

5.2.3. HNSAR y síndrome DOORS

Las mutaciones en el gen *TBC1D24* producen síndrome DOORS (*Deafness, Onychodystrophy, Osteodystrophy, mental Retardation and Seizures*, es decir, hipoacusia, onicodistrofia, osteodistrofia, discapacidad intelectual y convulsiones) y otros trastornos epilépticos [Stražičar et al., 2015], así como hipoacusias no sindrómicas tanto de herencia autosómica dominante [Azaiez et al., 2014] como recesiva [Rehman et al., 2014]. Hasta la fecha sólo se han descrito cinco mutaciones causantes de HNSAR en cuatro familias, dos pakistaníes [Rehman et al., 2014] y dos marroquíes [Bakhchane et al., 2015]. En este estudio, hemos identificado las mutaciones p.R40L y p.R214H en heterocigosis compuesta y segregando con la hipoacusia en una familia con HNSAR. La variante p.R40L ha sido descrita en homocigosis en una familia turca como causante de síndrome DOORS [Campeau et al., 2014]; por su parte, p.R214H se identificó en heterocigosis compuesta con la variante p.V439Vfs*32 en una familia y con la variante p.E153K en otra, segregando en ambos casos con la HNSAR en las familias [Bakhchane et al., 2015]. Se ha postulado que p.R214H es un alelo hipomórfico que, en *trans* con una mutación más grave produciría solamente HNSAR [Bakhchane et al., 2015]. La familia identificada en nuestro estudio apoyaría dicha teoría.

5.2.4. HNSAR y otros síndromes

En este trabajo, la secuenciación de exomas completos ha revelado la posible implicación de dos genes de hipoacusias sindrómicas en HNSAR: *SLITRK6* y *GATA3*.

En el gen *SLITRK6* encontramos una mutación *missense* con bajísima frecuencia en las bases de datos, en homocigosis. Hasta la fecha sólo se habían descrito en la literatura 3 mutaciones patogénicas en el gen *SLITRK6* en 4 familias diferentes (Tabla 31). Todas las mutaciones eran de tipo *nonsense* y en los individuos afectados se asociaba miopía magna bilateral a la hipoacusia. La reinvestigación clínica de uno de los individuos afectados reveló miopía magna unilateral. Nuestra hipótesis de trabajo es que la mutación *missense* encontrada pudiera tener efectos patogénicos más leves o menor penetrancia que las mutaciones truncantes hasta ahora descritas. La confirmación de la patogenicidad de la mutación encontrada en este trabajo requiere experimentos adicionales (ensayos funcionales, modelos animales...) pero, de confirmarse, puede significar que otras mutaciones de tipo *missense* podrían causar miopías tan leves o poco penetrantes que pasasen desapercibidas en la historia clínica, de forma que el caso se registrase como HNSAR.

Tabla 31. Mutaciones identificadas hasta la fecha en el gen *SLITRK6* causantes de hipoacusia y miopía.

Origen	Tipo	Cambio	Estado	Clínica	Descrita por
Grecia	<i>Nonsense</i>	c.541C>T/p.R181*	Homocigosis	Hipoacusia y miopía	[Tekin et al., 2013]
Turquía	<i>Nonsense</i>	c.890C>A/p.S297*	Homocigosis	Hipoacusia y miopía	[Tekin et al., 2013]
España	<i>Missense</i>	c.1196T>C/p.I399T	Homocigosis	Hipoacusia y miopía	Este trabajo
Amish	<i>Nonsense</i>	c.1240C>A/p.Q414*	Homocigosis	Hipoacusia y miopía	[Tekin et al., 2013]
Amish	<i>Nonsense</i>	c.1240C>A/p.Q414*	Homocigosis	Hipoacusia con neuropatía auditiva y miopía	[Morlet et al., 2014]

Las mutaciones en el gen *GATA3* causan síndrome HDR (*Hypoparathyroidism, Sensorineural Deafness and Renal Disease*, hipoparatiroidismo, hipoacusia y trastornos renales), de herencia autosómica dominante. Hemos encontrado una familia con HNSAR en la que los dos hijos afectados portan una mutación no presente en los padres biológicos confirmados, lo cual parece corresponder a un mosaicismo de la línea germinal paterna.

La mutación afecta al dominio Zn1, requerido para el correcto funcionamiento del factor transcripcional GATA3, y se encuentra muy próxima a otras cuatro mutaciones que sí causan síndrome HDR. Sin embargo, los pacientes de esta familia no muestran los signos clínicos que acompañan a la hipoacusia en dicho síndrome. El síndrome HDR se produce por un mecanismo patogénico de haploinsuficiencia. La hipoacusia es el signo clínico con mayor penetrancia en esta patología, aparece en todos los pacientes y casi siempre está presente al nacimiento. Más del 90% de los pacientes tienen además hipoparatiroidismo y más del 80% algún problema renal [Upadhyay et al., 2013]. No se habían descrito pacientes que presentaran la hipoacusia de forma aislada hasta hace unos meses, cuando se identificó una mutación claramente patogénica (c.149delT/p.F51Lfs*144) que segregaba con la enfermedad en una familia grande taiwanesa, en la que los afectados no habían referido otros signos clínicos aparte de la hipoacusia. Tras una revisión clínica exhaustiva, se advirtió que 1 de los 9 afectados tenía problemas renales, pero el resto sólo presentaban hipoacusia [Lin et al., 2015], como sucede en los individuos afectados de la familia S839. Los efectos reales de la mutación de *GATA3* encontrada en este trabajo deberán ser investigados mediante ensayos funcionales. Por otra parte, dada la presencia de una mutación truncante en heterocigosis en el gen *TSPEAR* en los dos individuos afectados, no se puede descartar formalmente que exista un segundo alelo mutante de este gen que haya escapado a la detección (mutación intrónica profunda, delección...), aspectos que serán investigados en futuros estudios.

5.2.5. Gen de la pejavakina: HNSAR y neuropatía auditiva

Con el término Neuropatía Auditiva (NA) se definió un subtipo de hipoacusia caracterizada por presentar PEATC muy distorsionados o ausentes y OEAs normales [Starr et al. 1996]. Estas pruebas proporcionan información topográfica de la lesión, ya que las OEAs evalúan la normalidad funcional de las células ciliadas externas del órgano de Corti, mientras que los PEATC exploran la porción periférica del nervio auditivo y su recorrido por el tronco cerebral. Por tanto, la lesión primaria en la NA puede estar localizada en las células ciliadas internas (NA presináptica) o en las vías nerviosas auditivas (NA postsináptica). Dependiendo de la localización de la lesión, los implantes cocleares pueden estar indicados (NA presináptica) o contraindicados (NA postsináptica).

Existen causas ambientales de NA, entre las que se encuentran la hiperbilirrubinemia y la hipoxia neonatal. En otros casos, la NA es uno más de los signos clínicos resultantes de una enfermedad neurodegenerativa sistémica (por ejemplo, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la ataxia de Friedreich y algunos trastornos

mitocondriales). Finalmente, en otros casos se trata de una entidad aislada, y debe ser considerada un subtipo de HNS.

Hasta el momento, se conocen solamente dos genes cuyas mutaciones producen NA aislada: *OTOF* y *PJVK*. En un estudio realizado en nuestro laboratorio sobre los pacientes recopilados por un consorcio multicéntrico internacional, se pudo determinar que las mutaciones en el gen *OTOF* son una causa principal de NA aislada (55-87% de los pacientes con NA de causa no ambiental en diferentes poblaciones) [Rodríguez-Ballesteros et al., 2008]. Por su parte, la implicación de *PJVK* había sido concluida a partir de un único estudio, sobre cuatro familias iraníes de difícil acceso, y a partir de los datos obtenidos de un modelo *knock-in* murino [Delmaghani et al., 2006].

Hasta la realización de este trabajo de tesis, sólo se habían identificado 14 mutaciones patogénicas en el gen *PJVK* (Tabla 32). De ellas, solamente dos (p.T54I, en homocigosis en una familia, y p.R183W, en homocigosis en tres familias) se habían asociado con NA aislada [Delmaghani et al., 2006]. En un estudio posterior, se encontró la mutación p.R183W en homocigosis en una familia turca con HNSAR pero sin NA [Collin et al. 2007]. Este resultado, aunque se podría interpretar sobre la base de hipotéticos modificadores del fenotipo, distintos entre las familias iraníes y la turca, sembró dudas sobre la implicación de *PJVK* en NA aislada. Nuestro trabajo añade tres nuevos casos y cuatro mutaciones más al espectro, y arroja alguna luz sobre las correlaciones genotipo-fenotipo.

En la familia española con mutaciones en *PJVK* (S269), el diagnóstico era de HNS. Aunque en su día los afectos no fueron sometidos al cribado neonatal de hipoacusias, no se les detectaron OEA a edades relativamente tempranas (6 años en el hermano mayor, 3 en el menor). No se puede, sin embargo, descartar que las OEA estuvieran presentes con anterioridad y que se hayan perdido en ese corto intervalo, ya que se han descrito casos con estas características en pacientes con NA auditiva causada por mutaciones en *OTOF* [Rodríguez-Ballesteros et al., 2003]. Por su parte, los casos esporádicos E1471 y DAN7 forman parte de nuestra colección de familias con NA aislada en las que se han excluido las mutaciones en *OTOF*. Estos resultados definitivamente establecen que las mutaciones en *PJVK* pueden causar NA aislada, si bien son una causa minoritaria de la misma, al contrario de lo que ocurre con el gen *OTOF*. Además, nuestros datos sugieren que la hipoacusia de tipo DFNB59 tiene también una baja frecuencia en el conjunto de las HNSAR. Como se deduce de la (Tabla 32), no parece existir una clara correlación entre el tipo de mutación y el desarrollo de NA. Se observa que todos los casos de DFNB59 con

NA llevan al menos una mutación de sustitución de aminoácido (*missense*), pero hay también casos con mutaciones *missense* en los que no se ha descrito NA.

Tabla 32. Mutaciones descritas hasta la fecha en el gen *PJVK* (*DFNB59*).

Exón	Mutación	NA	Descrita
2	c.113dupT/p.K41Efs*8	No	[Ebermann et al., 2007]
2	c.122delA/p.K41Sfs*18	No	[Schwander et al., 2007]
		No	[Babanejad et al., 2012]
2	c.161C>T/p.T54I	Sí	[Delmaghani et al., 2006]
3	c.274C>T/p.R92*	No	[Babanejad et al., 2012]
3	c.406C>T/p.R136*	No	[Shahin et al., 2010]
		No	[Borck et al., 2012]
4	c.499C>T/p.R167*	No	[Collin et al., 2007]
4	c.509_512delCACT/p.S170Cfs*37 ⁽¹⁾	No	[Collin et al., 2007]
4	c.547C>T/p.R183W	Sí	[Delmaghani et al., 2006]
		No	[Collin et al., 2007]
4	c.548G>A/p.R183Q ⁽¹⁾	No	[Wang et al., 2011]
6	c.671T>G/p.L224R	No	Este trabajo
6	c.726delT/p.F242Lfs*7	No	[Chaleshtori et al., 2007]
6	c.731T>G/p.L244R ⁽¹⁾	No	[Collin et al., 2007]
7	c.880delC/p.H294Lfs*43	No	Este trabajo
7	c.880C>G/p.H294D	Sí	Este trabajo
7	c.930_931delAC/p.C312Wfs*19	No	[Zhang et al., 2015]
7	c.950delT/p.F317Sfs*20	Sí	Este trabajo
7	c.988delG/p.V330Lfs*7	No	[Chaleshtori et al., 2007]
7	c.1028G>C/p.C343S	?	[Mujtaba et al., 2012]
		Sí	Este trabajo

⁽¹⁾ Descritas en pacientes con un solo alelo mutante. (NA): Neuropatía Auditiva.

La identificación del gen implicado en los casos de NA aislada de causa genética tiene consecuencias importantes para el tratamiento de la misma, ya que puede proporcionar información sobre la localización de la lesión (presináptica o postsináptica). Por otra parte, permite estudiar los resultados de los implantes cocleares en grupos de pacientes etiológicamente homogéneos, con mutaciones en el mismo gen, y extraer conclusiones válidas para decidir sobre la realización o no del implante en futuros pacientes. La expresión del gen de la peyvakina en la cóclea humana es aún motivo de debate, pero parece confirmado que se expresa en las vías nerviosas auditivas

[Delmaghani et al., 2006], [Liu et al., 2013]. Teniendo esto en cuenta, se hipotetizó que el implante coclear no estaría indicado en los casos de NA con mutaciones en *PJVK*. En este trabajo describimos por primera vez los resultados reales del implante coclear en un caso de NA aislada con mutaciones en *PJVK*. Contra lo que se esperaba, parecen ser satisfactorios, aunque se necesita un seguimiento del paciente a más largo plazo para establecer firmemente este dato. Generalizar la conclusión de no contraindicación del implante coclear en pacientes con NA y mutaciones en *PJVK* requerirá incrementar la casuística.

5.3. Diagnóstico genético-molecular de HNSAR

Desde mediados de la década de los noventa del siglo pasado hasta fechas recientes, el diagnóstico genético molecular de la HNSAR se ha basado en el cribado del gen *GJB2* y de las delecciones del locus DFNB1 que pueden afectar o no al gen vecino *GJB6*. Este cribado, realizado mediante muy variadas metodologías, era sencillo y económico, y permitía aclarar entre el 10% y el 50% de los casos de HNSAR en la mayoría de las poblaciones. Sin embargo, mientras que la identificación de nuevos genes implicados en HNSAR avanzaba rápidamente, hasta alcanzar los más de 60 que se conocen en la actualidad, el diagnóstico molecular no iba extendiéndose para incluirlos en la rutina de laboratorio. La razón por la que esto sucedía era que cribar un número tan elevado de genes, algunos de ellos muy grandes, con una frecuencia de mutaciones muy baja en cada uno de ellos, era inviable en términos de tiempo, esfuerzo y coste económico.

Las progresiva introducción de las técnicas de secuenciación masiva, primero en los proyectos de investigación, y luego en la práctica de los laboratorios asistenciales, ha permitido dar un completo vuelco a la situación. El porcentaje de casos aclarados con las nuevas metodologías se ha incrementado, si bien en distinta medida en las diferentes poblaciones. En este aspecto son útiles los estudios de epidemiología genética como el realizado en nuestro laboratorio a lo largo de varios años, y completado en este trabajo de tesis. En la muestra de 140 familias estudiadas, el 45% de los casos llevan mutaciones en el locus DFNB1 (genes *GJB2* y *GJB6*). El cribado de otros 50 genes implicados en HNSAR permitió aclarar un 30% adicional, quedando un 25% de los casos pendientes de elucidar. Estos datos permiten predecir que un cribado realizado mediante un panel de secuenciación masiva que incluya estos 50 genes debería permitir más de la mitad de los casos de HNSAR no DFNB1 en la población española. En este trabajo de tesis hemos aplicado el panel comercial *OTO-NGS-Panel* al diagnóstico de 13 familias con HNSAR en las que ya habíamos excluido las mutaciones en el locus DFNB1. Pudimos elucidar 6 de los 13 casos (46%). Algunos de los genes de nuestro estudio epidemiológico no estaban

todavía incluidos en esta primera versión del panel y fue la secuenciación de exoma la que permitió aclarar tres casos más (en total, 9 de 13, es decir, el 69%). Aunque el número de casos cribados es todavía pequeño para cuantificar adecuadamente los beneficios de los paneles de genes, nuestros resultados apuntan a que lo esperado según nuestro estudio epidemiológico se cumple en la aplicación diagnóstica de la secuenciación masiva.

De nuestro trabajo se deduce que la estrategia más coste-efectiva para abordar el diagnóstico genético de la HNSAR en España es realizar el estudio en dos pasos. Se empezaría por cribar el locus *DFNB1* mediante un único ensayo de secuenciación Sanger del gen *GJB2* (toda la región codificante se abarca en un solo amplicón), y mediante la PCR múltiple específicamente diseñada para la detección de deleciones frecuentes en la región [del Castillo et al., 2005]. En un segundo paso, los casos negativos deberían someterse al cribado mediante el panel de secuenciación masiva de genes de hipoacusia. En este punto es importante destacar que los genes a incluir en los paneles de secuenciación masiva deben ser cuidadosamente seleccionados para incrementar la tasa de casos elucidados. Es evidente que deben estar presentes todos los genes cuya implicación en HNSAR se haya demostrado, pero también algunos genes cuyas mutaciones son responsables de hipoacusias sindrómicas, bien sea porque la hipoacusia es el primer signo clínico en aparecer y el diagnóstico inicial es de HNSAR (como en el síndrome Usher), o porque mutaciones leves o poco penetrantes pueden producir fenotipos no sindrómicos (como en los casos de síndrome HDR o de miopía magna con hipoacusia). Nuestro trabajo ilustra una vez más la delgada línea que separa las hipoacusias sindrómicas de las no sindrómicas, conceptos que ayudan a la clasificación de los trastornos pero que no deben confundirnos a la hora de valorar cada caso concreto.

La secuenciación masiva de paneles de genes o de exomas completos son herramientas fundamentales para la investigación y el diagnóstico en Genética Humana, pero debemos recordar que no permiten identificar todas las posibles alteraciones de un genoma, por ejemplo los grandes reordenamientos genéticos, las mutaciones que afectan al *splicing* y las variaciones epigenéticas. Si bien se puede intentar extraer datos sobre variaciones de número de copias o sobre mutaciones que afectan a los sitios canónicos de *splicing* a partir de los datos de secuenciación masiva de paneles de genes, revelar aquellos tipos de alteraciones suele requerir tecnologías específicas.

Las mutaciones que afectan al *splicing* se pueden descubrir investigando sus efectos sobre la composición de exones del ARNm. Cuando no se puede disponer de muestras de ARN del tejido en el que se está interesado (como ocurre en el caso del oído interno de los pacientes), una solución clásica ha sido el estudio en un sistema de

minigenes. Aunque útil, esta metodología no deja de ser propensa a posibles artefactos, ya que el contexto genético no es idéntico al natural. Por otra parte, este sistema no permite investigar posibles mutaciones intrónicas profundas que, por ejemplo, generen pseudoexones. Por esta razón, puede ser útil identificar tejidos alternativos, de los que idealmente sea fácil obtener muestras de individuos vivos. En un estudio pionero, se demostró que se pueden detectar transcritos de la mayoría de los genes implicados en el síndrome de Usher en muestras de epitelio nasal obtenidas mediante raspado del mismo [Vaché et al., 2010]. Esta técnica fue empleada con éxito en la identificación de una mutación intrónica profunda en el gen *USH2A*, que producía la incorporación de un pseudoexón [Vaché et al, 2012]. En este trabajo hemos investigado la expresión de los genes implicados en HNSAR en tres tejidos que se pueden obtener con mínimas molestias para el paciente (sangre, orina y saliva) mediante una combinación de *ARN-seq* y RT-PCR. Los resultados preliminares que aquí hemos presentado indican que la mejor fuente de transcritos, por su variedad y su cantidad, es la sangre, y que algunos transcritos no presentes en sangre se pueden detectar en orina. Esta información abre la posibilidad de investigar la hipotética existencia de mutaciones que afectan al *splicing* en individuos cuya causa molecular de hipoacusia permanece sin aclarar (de particular utilidad en el caso de pacientes con un solo alelo mutante de un gen de HNSAR).

Finalmente, este trabajo ilustra las dificultades que entraña descifrar las causas moleculares de las hipoacusias no sindrómicas, como ocurre en otros casos de enfermedades con gran heterogeneidad genética: variantes de patogenicidad dudosa, pacientes con un solo alelo mutante, solapamiento de formas sindrómicas y no sindrómicas, numerosos genes implicados aún pendientes de descubrir... Para enfrentarse a muchas de estas dificultades es necesario disponer de datos clínicos fiables y lo más exhaustivos que sea posible, así como contar con la experiencia necesaria para analizar correctamente la multitud de datos que proporcionan las nuevas tecnologías genómicas y situarlos en el contexto de la enfermedad que estamos estudiando.

6. CONCLUSIONES

1. Los genes *MYO7A*, *CDH23*, *PCDH15* y *PJVK* son responsables cada uno de aproximadamente un 1% de los casos familiares con un diagnóstico inicial de HNS de la cohorte estudiada, lo que los sitúa en el grupo de genes con contribuciones bajas pero significativas a la HNSAR en la población española. Sin embargo, una mayoría de los casos con mutaciones en *MYO7A*, *CDH23* y *PCDH15* corresponden a pacientes con síndrome de Usher en los que la retinosis pigmentaria aún no se ha manifestado.
2. Nuestros resultados confirman que las mutaciones en el gen *PJVK* causan neuropatía auditiva aislada, pero dan cuenta de una muy baja proporción de casos.
3. Hemos identificado 28 mutaciones causantes de hipoacusia, de las cuales 18 no habían sido descritas previamente, lo cual confirma que la mayoría de las mutaciones responsables de HNSAR no son recurrentes, sino que probablemente son privadas.
4. Los paneles de secuenciación masiva que incluyen todos los genes cuya implicación en HNSAR se conoce actualmente, tienen el potencial de elucidar aproximadamente el 75% de los casos. La estrategia más coste-efectiva para abordar el diagnóstico genético de la HNSAR en España es realizar secuenciación Sanger del gen *GJB2* y PCR múltiple para la detección de deleciones frecuentes en el locus *DFNB1*. En un segundo paso, los casos negativos deben someterse al cribado mediante un panel de secuenciación masiva de genes de hipoacusia.
5. La frontera entre las hipoacusias sindrómicas y no sindrómicas es a veces muy difusa por la aparición tardía de los signos clínicos que acompañan a la hipoacusia y por su expresividad variable. En consecuencia, es recomendable que los genes implicados en hipoacusias sindrómicas frecuentes que cumplan las condiciones mencionadas sean incluidos en los paneles de secuenciación masiva.
6. Los genes *SLITRK6* y *GATA3*, implicados en el síndrome de hipoacusia-miopía magna y en el síndrome HDR, respectivamente, son candidatos a responsables de hipoacusias no sindrómicas.
7. La mayoría de los genes relacionados con HNSAR se expresan en al menos uno de los tejidos de fácil muestreo estudiados (sangre, saliva y orina), detectándose en sangre en mayor variedad y cantidad.

7. ARTÍCULOS PUBLICADOS

ARTÍCULOS A LOS QUE HA DADO LUGAR EL TRABAJO

Enviado a la revista PlosOne:

Domínguez-Ruiz M, Rodríguez-Ballesteros M, Gandía M, Gómez-Rosas E, Villamar M, Cama E, Scimemi P, Mancini P, Rendtorff ND, Moreno-Pelayo MA, Tranebjaerg L, Medá C, Santarelli R and del Castillo I. Novel mutations in DFNB59, the gene encoding pejvakin, in subjects with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment and auditory neurophathy spectrum disorder.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Gandía M, Fernández-Toral J, Solanellas J, **Domínguez-Ruiz M**, Gómez-Rosas E, Del Castillo FJ, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo I. Mutations in PRPS1 causing syndromic or nonsyndromic hearing impairment: intrafamilial phenotypic variation complicates genetic counseling. *Pediatr Res*. 2015 Jul;78(1):97-102.

Seco CZ, Oonk AM, **Domínguez-Ruiz M**, Draaisma JM, Gandía M, Oostrik J, Neveling K, Kunst HP, Hoefsloot LH, del Castillo I, Pennings RJ, Kremer H, Admiraal RJ, Schraders M. Progressive hearing loss and vestibular dysfunction caused by a homozygous nonsense mutation in CLIC5. *Eur J Hum Genet*. 2015 Feb;23(2):189-94.

Schraders M, Ruiz-Palmero L, Kalay E, Oostrik J, del Castillo FJ, Sezgin O, Beynon AJ, Strom TM, Pennings RJ, Seco CZ, Oonk AM, Kunst HP, **Domínguez-Ruiz M**, García-Arumi AM, del Campo M, Villamar M, Hoefsloot LH, Moreno F, Admiraal RJ, del Castillo I, Kremer H. Mutations of the gene encoding otogelin are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic moderate hearing impairment. *Am J Hum Genet*. 2012 Nov 2;91(5):883-9.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD et al.. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **2000** 287:2185-2195

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. *Nat Methods* **2010** 7(4):248-249.

Ahmed ZM, Riazuddin Sa, Bernstein SL, Ahmed Z, Khan S, Griffith AJ, Morell RJ, Friedman TB, Riazuddin Sh and Wilcox ER. Mutations of the Protocadherin Gene *PCDH15* Cause Usher Syndrome Type 1F. *Am J Hum Genet* **2001**, 69:25-34.

Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad J, Bernstein SL, Guo Y, Sabar MF, Sieving P, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB, Belyantseva IA, Wilcox ER. *PCDH15* is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet.* **2003** Dec 15;12(24):3215-23.

Ahmed ZM, Riazuddin S, Aye S, Ali RA, Venselaar H, Anwar S, Belyantseva PP, Qasim M, Riazuddin S, Friedman TB. Gene structure and mutant alleles of *PCDH15*: nonsyndromic deafness DFNB23 and type 1 Usher syndrome. *Hum Genet.* **2008** Oct;124(3):215-23.

Alagramam KN, Yuan H, Kuehn MH et al.. Mutations in the novel protocadherin *PCDH15* cause Usher syndrome type 1F. *Hum mol genet* **2001**; 10:1709-18.

Ali A, Christie PT, Grigorieva IV, Harding B, Van Esch H, Ahmed SF, Bitner-Glindzicz M, Blind E, Bloch C, Christin P, Clayton P, Gecz J, Gilbert-Dussardier B, Guillen-Navarro E, Hackett A, Halac I, Hendy GN, Laloo F, Mache CJ, Mughal Z, Ong AC, Rinat C, Shaw N, Smithson SF, Tolmie J, Weill J, Nesbit MA, Thakker RV. Functional characterization of GATA3 mutations causing the hypoparathyroidism-deafness-renal (HDR) dysplasia syndrome: insight into mechanisms of DNA binding by the GATA3 transcription factor. *Hum Mol Genet.* **2007** Feb 1;16(3):265-75.

Aller E, Jaijo T, García-García G, Aparisi MJ, Blesa D, Díaz-Llopis M, Ayuso C and Millan JM. Identification of large rearrangements of the *PCDH15* gene by combined MLPA and oligonucleotide CGH-array: Large duplications are responsible for Usher syndrome. *Inves Ophthalmol Vis Sci* **2010**. 10: 5359.

Astuto LM, Kelley PM, Askew JW, Weston MD, Smith RJ, Alswaid AF, Al-Rakaf M, Kimberling WJ. Searching for evidence of DFNB2. *Am J Med Genet.* **2002a** may 15;109(4):291-7.

Astuto LM, Bork JM, Weston MD, Askew JW, Fields RR, Orten DJ, Ohliger SJ, Riazuddin S, Morell RJ, Khan S, Riazuddin S, Kremer H, van Hauwe P, Moller CG, Cremers CW, Ayuso C, Heckenlively JR, Rohrschneider K, Spandau U, Greenberg J, Ramesar R, Reardon W, Bitoun P, Millan J, Legge R, Friedman TB, Kimberling WJ. *CDH23* mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet.* **2002b** aug;71(2):262-75.

Azaiez H, Booth KT, Bu F, Huygen P, Shibata SB, Shearer AE, Kolbe D, Meyer N, Black-Ziegelbein EA, Smith RJ. TBC1D24 mutation causes autosomal-dominant nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat.* **2014** Jul;35(7):819-23.

Babanejad M, Fattahi Z, Bazazzadegan N, Nishimura C, Meyer N, Nikzat N, Sohrabi E, Najmabadi A, Jamali P, Habibi F, Smith RJ, Kahrizi K, Najmabadi H. A comprehensive study to determine heterogeneity of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Iran. *Am J Med Genet A.* **2012** Oct;158A(10):2485-92.

Bakhchane A, Charif M, Salime S, Boulouiz R, Nahili H, Roky R, Lenaers G, Barakat A. Recessive TBC1D24 Mutations Are Frequent in Moroccan Non-Syndromic Hearing Loss Pedigrees. *PLoS One*. **2015** Sep 15;10(9):e0138072.

Berezin C, Glaser F, Rosenberg J, Paz I, Pupko T, Fariselli P, Casadio R and Ben-Tal N. ConSeq: The Identification of Functionally and Structurally Important Residues in Protein Sequences. *Bioinformatics*. **2004** Vol. 20 1322-1324,

Beurg M, Xiong W, Zhao B, Müller U and Fettiplace R, Subunit determination of the conductance of hair-cell mechanotransducer channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2015** Feb 3; 112(5): 1589–1594.

Blanchet C, Roux AF, Hamel C, Ben Salah S, Artières F, Faugère V, Uziel A, Mondain M. [Usher type I syndrome in children: genotype/phenotype correlation and cochlear implant benefits]. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. **2007**;128(3):137-43.

Bolz H, von Brederlow B, Ramírez A, Bryda EC, Kutsche K, Nothwang HG, Seeliger M, del C-Salcedó Cabrera M, Vila MC, Molina OP, Gal A, Kubisch C. Mutation of *CDH23*, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Gene*. **2001**; 27(1):108-12.

Borck G, Ur Rehman A, Lee K, Pogoda HM, Kakar N, von Ameln S, Grillet N, Hildebrand MS, Ahmed ZM, Nürnberg G, Ansar M, Basit S, Javed Q, Morell RJ, Nasreen N, Shearer AE, Ahmad A, Kahrizi K, Shaikh RS, Ali RA, Khan SN, Goebel I, Meyer NC, Kimberling WJ, Webster JA, Stephan DA, Schiller MR, Bahlo M, Najmabadi H, Gillespie PG, Nürnberg P, Wollnik B, Riazuddin S, Smith RJ, Ahmad W, Müller U, Hammerschmidt M, Friedman TB, Riazuddin S, Leal SM, Ahmad J, Kubisch C. Loss-of-function mutations of *ILDR1* cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. *Am J Hum Genet*. **2011** Feb 11;88(2):127-37.

Borck G, Rainshtein L, Hellman-Aharony S, Volk AE, Friedrich K, Taub E, Magal N, Kanaan M, Kubisch C, Shohat M, Basel-Vanagaite L. High frequency of autosomal-recessive DFNB59 hearing loss in an isolated Arab population in Israel. *Clin Genet*. **2012** Sep;82(3):271-6.

Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed ZM, Ness SL, Polomeno R, Ramesh A, Schloss M, Srisailpathy CR, Wayne S, Bellman S, Desmukh D, Ahmed Z, Khan SN, Kaloustian VM, Li XC, Lalwani A, Riazuddin S, Bitner-Glindzicz M, Nance WE, Liu XZ, Wistow G, Smith RJ, Griffith AJ, Wilcox ER, Friedman TB, Morell RJ. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene *CDH23*. *Am J Hum Gene*. **2001**;68(1):26-37.

Brownstein Z, Friedman LM, Shahin H, Oron-Karni V, Kol N, Abu Rayyan A, Parzefall T, Lev D, Shalev S, Frydman M, Davidov B, Shohat M, Rahile M, Lieberman S, Levy-Lahad E, Lee MK, Shomron N, King MC, Walsh T, Kanaan M, Avraham KB. Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in Middle Eastern families. *Genome Biol*. **2011** Sep 14;12(9):R89.

Campeau PM, Kasperaviciute D, Lu JT, Burrage LC, Kim C, Hori M, Powell BR, Stewart F, Félix TM, van den Ende J, Wisniewska M, Kayserili H, Rump P, Nampoothiri S, Aftimos S, Mey A, Nair LD, Begleiter ML7, De Bie I, Meenakshi G, Murray ML, Repetto GM, Golabi M, Blair E, Male A, Giuliano F, Kariminejad A, Newman WG, Bhaskar SS, Dickerson JE, Kerr B, Banka S, Giltay JC, Wiczorek D, Tostevin A, Wiszniewska J, Cheung SW, Hennekam RC, Gibbs

RA, Lee BH, Sisodiya SM. The genetic basis of DOORS syndrome: an exome-sequencing study. *Lancet Neurol.* **2014** Jan;13(1):44-58.

Cartegni L., Wang J., Zhu Z., Zhang M. Q., Krainer A. R.; 2003. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acid Research*, **2003**, 31(13): 3568-3571.

Celniker G., Nimrod G., Ashkenazy H., Glaser F., Martz E., Mayrose I., Pupko T., and Ben-Tal N. ConSurf: Using Evolutionary Data to Raise Testable Hypotheses about Protein Function. *Isr. J. Chem.* **2013** March 10, doi: 10.1002/ijch.201200096

Chaleshtori MH, Simpson MA., Farrokhi E., Dolati M., Rad, LH., Geshnigani SA., Crosby AH. Novel mutations in the pejvak gene are associated with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Iranian families. (Letter) *Clin. Genet.* **2007** 72: 261-263.

Chan DK and **Chang** KW. GJB2-associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype. *Laryngoscope.* **2014** Feb;124(2):E34-53.

Chien WW, Leiding JW, Hsu AP, Zalewski C, King K, Holland SM, Brewer C. Auditory and vestibular phenotypes associated with GATA3 mutation. *Otol Neurotol.* **2014** Apr;35(4):577-81.

Chiu WY, Chen HW, Chao HW, Yann LT, Tsai KS. Identification of three novel mutations in the GATA3 gene responsible for familial hypoparathyroidism and deafness in the Chinese population. *J Clin Endocrinol Metab.* **2006** Nov;91(11):4587-92.

Collin RW, Kalay E, Oostrik J, Caylan R, Wollnik B, Arslan S, den Hollander AI, Birinci Y, Lichtner P, Strom TM, Toraman B, Hoefsloot LH, Cremers CW, Brunner HG, Cremers FP, Karaguzel A, Kremer H. Involvement of DFNB59 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Hum Mutat.* **2007** Jul;28(7):718-23.

Cosgrove D and **Zallocchi** M. Usher protein functions in hair cells and photoreceptors. *Int J Biochem Cell Biol.* **2014** Jan; 46: 80–89.

Cremers FP, Kimberling WJ, Külm M, de Brouwer AP, van Wijk E, te Brinke H, Cremers CW, Hoefsloot LH, Banfi S, Simonelli F, Fleischhauer JC, Berger W, Kelley PM, Haralambous E, Bitner-Glindzicz M, Webster AR, Saihan Z, De Baere E, Leroy BP, Silvestri G, McKay GJ, Koenekoop RK, Millan JM, Rosenberg T, Joensuu T, Sankila EM, Weil D, Weston MD, Wissinger B, Kremer H. Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *Med Genet* **2007**;44:153-160.

Davenport SLH, Omenn GS. The heterogeneity of Usher Syndrome. Amsterdam Excerpta Media Foundation. International Congress ser abstr. **1977**; 215:87-88.

del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering KR, Weil D, Wuyts W, Aguirre LA, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Villamar M, Avraham KB, Dahl HH, Kanaan M, Nance WE, Petit C, Smith RJ, Van Camp G, Sartorato EL, Murgia A, Moreno F, del Castillo I. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet.* **2005** Jul;42(7):588-94.

del Castillo FJ and **del Castillo** I. The DFNB1 subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Front Biosci* **2011** Jun 1;16:3252-74.

del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Moreno F. Bases genéticas de las hipoacusias. En Tratado de Otorrinología y Cirugía de cabeza y cuello. 2ª Edición. Suárez C, Gial-Carcedo LM, Marco J, Medina JE, Ortega P, Trinidad J (eds.); Editorial Médica Panamericana, Madrid **2007**; Tomo 2 (Otología), cap 117: 1719-1741.

Delmaghani S, del Castillo FJ, Michel V, Leibovici M, Aghaie A, Ron U, Van Laer L, Ben-Tal N, Van Camp G, Weil D, Langa F, Lathrop M, Avan P, Petit C. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat Genet.* **2006** Jul;38(7):770-8.

Duman D, Sirmaci A, Cengiz FB, Ozdag H, Tekin M. Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers.* **2011** Jan-Feb;15(1-2):29-33.

Duman D and Tekin M. Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: a review *Front Biosci.* **2013** ; 17: 2213–2236.

Dylan K. Chan, MD, PhD; Kay W. Chang, MD. Systematic Review GJB2-Associated Hearing Loss: Systematic Review of Worldwide. Prevalence, Genotype, and Auditory Phenotype VC **2013**. The American Laryngological, Rhinological and Otological Society, Inc.

Ebermann I, Walger M, Scholl HP, Charbel Issa P, Lüke C, Nürnberg G, Lang-Roth R, Becker C, Nürnberg P, Bolz HJ. Truncating mutation of the DFNB59 gene causes cochlear hearing impairment and central vestibular dysfunction. *Hum Mutat.* **2007** Jun;28(6):571-7.

Eudy JD, Weston MD, Yao S, Hoover DM, Rehm HL, et al.. Mutation of a gene encoding a protein with extracellular matrix motifs in Usher syndrome type IIa. *Science* **1998** 280: 1753–1757

Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science.* **2002** Aug 9;297(5583):1007-13.

Flicek P et al.. Searle Ensembl. *Nucleic Acids Research* **2014** 42 Database issue:D749-D755.

Francey LJ, Conlin LK, Kadesch HE, Clark D, Berrodin D, Sun Y, Glessner J, Hakonarson H, Jalas C, Landau C, Spinner NB, Kenna M, Sagi M, Rehm HL, Krantz ID. Genome-wide SNP genotyping identifies the Stereocilin (STRC) gene as a major contributor to pediatric bilateral sensorineural hearing impairment. *Am J Med Genet A.* **2012** Feb;158A(2):298-308.

Fukami M, Muroya K, Miyake T, Iso M, Kato F, Yokoi H, Suzuki Y, Tsubouchi K, Nakagomi Y, Kikuchi N, Horikawa R, Ogata T. GATA3 abnormalities in six patients with HDR syndrome. *Endocr J.* **2011**;58(2):117-21.

Gaynor KU, Grigorieva IV, Nesbit MA, Cranston T, Gomes T, Gortner L, Thakker RV. A missense GATA3 mutation, Thr272Ile, causes the hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* **2009** Oct;94(10):3897-904.

Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, Liu C, Shi W, Bryant SH. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res.* **2010** Jan; 38 (Database issue):D492-6

Grillet N, Schwander M, Hildebrand MS, Sczaniecka A, Kolatkar A, Velasco J, Webster JA, Kahrizi K, Najmabadi H, Kimberling WJ, Stephan D, Bahlo M, Wiltshire T, Tarantino LM, Kuhn P, Smith RJ, Müller U. Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved

stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. *Am J Hum Genet.* **2009** Sep;85(3):328-37.

Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M and Weissenbach J. The Génethon human genetic linkage map. *Nature Genetics* **1994.** 7, 246 - 339

Hasson T, Heintzelman MB, Santos-Sacchi J, Corey DP, Mooseker MS. Expression in cochlea and retina of myosin VIIa, the gene product defective in Usher syndrome type 1B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1995** Oct 10;92(21):9815-9.

Hasson T, Gillespie PG, GarcíaJA, MacDonald RB, Zhao Y, Yee AG, Mooseker MS, and Corey DP. Unconventional Myosins in Inner-Ear Sensory Epithelia. The Rockefeller University Press. June 16, **1997.** JCB vol. 137 no. 6 1287-1307.

Higashi T, Katsuno T, Kitajiri S, Furuse M. Deficiency of angulin-2/ILDR1, a tricellular tight junction-associated membrane protein, causes deafness with cochlear hair cell degeneration in mice. *PLoS One.* **2015** Mar 30;10(3):e0120674.

Hildebrand MS, Thorne NP, Bromhead CJ, Kahrizi K, Webster JA, Fattahi Z, Bataejad M, Kimberling WJ, Stephan D, Najmabadi H, Bahlo M, and Smith RJH. Variable hearing impairment in a DFNB2 family with a novel *MYO7A* missense mutation. *Clin Genet.* Jun **2010;** 77(6): 563–571.

Hildebrand MS, Morín M, Meyer NC, Mayo F, Modamio-Hoybjor S, Mencía A, Olavarrieta L, Morales-Angulo C, Nishimura CJ, Workman H, DeLuca AP, del Castillo I, Taylor KR, Tompkins B, Goodman CW, Schrauwen I, Wesemael MV, Lachlan K, Shearer AE, Braun TA, Huygen PL, Kremer H, Van Camp G, Moreno F, Casavant TL, Smith RJ, Moreno-Pelayo MA. DFNA8/12 caused by *TECTA* mutations is the most identified subtype of nonsyndromic autosomal dominant hearing loss. *Hum Mutat.* **2011** Jul;32(7):825-34.

Hutchin T, Coy NN, Conlon H, Telford E, Bromelow K, Blaydon D, Taylor G, Coghill E, Brown S, Trembat h R, Liu XZ, Bitner-GlindziczM, Mueller R. Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK – implications for genetic testing. *CI in Genet* **2005:** 68: 506–512.

Janecke AR, Meins M, Sadeghi M, Grundmann K, Apfelstedt - Sylla E, Zrenner E, Rosenberg, Gal A. Twelve novel myosin VIIa mutations in 34 patients with Usher syndrome type I: confirmation of genetic heterogeneity. *Hum Mutat* **1999.** 13133–140.140

Kalatzis V and **Petit** C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Molec Genet.* **1998,** 7 (10): 1589-1597

Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc.* **2000;**33(2):51-6.

Klomp AE, Teofilo K, Legacki E, Williams DS. Analysis of the linkage of MYRIP and *MYO7A* to melanosomes by *RAB27A* in retinal pigment epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* **2007** Jun;64(6):474-87.

Kochhar A, Hildebrand MS, Smith RJ. Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genet Med.* **2007** Jul; 9(7): 393-408.

Kremer H, van Wijk E, Märker T, Wolfrum U and Roepman R. Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Hum Mol Genet*, **2006**, Vol.15. Review Issue No.2

Lagziel A, Overlack N, Bernstein SL, Morell RJ, Wolfrum U, Friedman TB. Expression of cadherin 23 isoforms is not conserved: implications for a mouse model of Usher syndrome type 1D. *Mol Vis*. **2009** Sep 12;15:1843-57.

Li H. et al.. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25. **2009**. 2078-2079

Lin YH, Wu CC, Hsu TY, Chiu WY, Hsu CJ, Chen PL. Identification of a novel GATA3 mutation in a deaf Taiwanese family by massively parallel sequencing. *Mutat Res*. **2015** Jan;771:1-5.

Liu X, Vansant G, Udovichenko IP, Wolfrum U, Williams DS. Myosin VIIa, the product of the Usher 1B syndrome gene, is concentrated in the connecting cilia of photoreceptor cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. **1997a**; 37(3):240-52.

Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJ, Steel KP, Brown SD. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet*. **1997b** Jun;16(2):188-90.

Liu XZ, Walsh J, Tamagawa Y, Kitamura K, Mishizawa M, Steel KP and Brown SD. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet*. **1997c** Nov; 17:268-69.

Liu X, Ondek B, Williams DS. Mutant myosin VIIa causes defective melanosome distribution in the RPE of shaker-1 mice. *Nat Genet* **1998**;19:117–118.

Liu W, Kinnefors A, Boström M, Edin F, Rask-Andersen H . Distribution of pejkakin in human spiral ganglion: An immunohistochemical study. *Cochlear Implants* **2013**; Int 14: 225-231.

Löppönen T, Dietz A, Väisänen ML, Valtonen H, Kosunen A, Hyvärinen A, Ignatius J, Löppönen H. Homozygous M34T mutation of the GJB2 gene associates with an autosomal recessive nonsyndromic sensorineural hearing impairment in Finnish families. *Acta Otolaryngol*. **2012** Aug;132(8):862-73.

Maniak M. Cell adhesion: Ushering in a new understanding of myosin VII. *Current Biology* **2001**, 11:R315–R317

Mazzoli M, Van Camp G, Newton V, Giarbini N, Declau F and Parving A. Recommendations for the description of genetic and audiological data for families with nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Audiological Medicine* **2003**, Vol. 1, No. 2 , Pages 148-150 .

Michalski N, Michel M, Bahloul A, Lefèvre G, Barral J, Yagi H, Chardenoux S, Weil D, Martin P,3 Hardelin JP, Sato M and Petit C. Molecular Characterization of the Ankle-Link Complex in Cochlear Hair Cells and Its Role in the Hair Bundle Functioning. *The Journal of Neuroscience*. **2007** June 13; 27(24):6478–6488

Migliosi V, Modamio-Høybjør S, Moreno-Pelayo MA, Rodríguez-Ballesteros M, Villamar M, Tellería D, Menéndez I, Moreno F, del Castillo I. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlina (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* **2002**;39:502–506

Millán JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A and Ayuso C. An Update on the Genetics of Usher Syndrome. *Journal of Ophthalmology*. Volume **2011**, Article ID 417217, 8 pages.

Moldovan O, Carvalho R, Jorge Z, Medeira A. A new case of HDR syndrome with severe female genital tract malformation: comment on "Novel mutation in the gene encoding the GATA3 transcription factor in a Spanish familial case of hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia (HDR) syndrome with female genital tract malformations" by Hernández et al.. *Am J Med Genet A*. **2011** Sep;155A(9):2329-30.

Morlet T, Rabinowitz MR, Looney LR, Riegner T, Greenwood LA, Sherman EA, Achilly N, Zhu A, Yoo E, O'Reilly RC, Jinks RN, Puffenberger EG, Heaps A, Morton H, Strauss KA. A homozygous SLITRK6 nonsense mutation is associated with progressive auditory neuropathy in humans. *Laryngoscope*. **2014** Mar;124(3):E95-103.

Mujtaba G, Bukhari I, Fatima A, Naz S. A p.C343S missense mutation in *PJVK* causes progressive hearing loss. *Gene*. **2012** Aug 1;504(1):98-101.

Muroya K, Hasegawa T, Ito Y, Nagai T, Isotani H, Iwata Y, Yamamoto K, Fujimoto S, Seishu S, Fukushima Y, Hasegawa Y, Ogata T. GATA3 abnormalities and the phenotypic spectrum of HDR syndrome. *J Med Genet*. **2001** Jun;38(6):374-80.

Nakamura A, Fujiwara F, Hasegawa Y, Ishizu K, Mabe A, Nakagawa H, Nagasaki K, Jo W, Tajima T. Molecular analysis of the GATA3 gene in five Japanese patients with HDR syndrome. *Endocr J*. **2011**;58(2):123-30.

Nesbit MA, Bowl MR, Harding B, Ali A, Ayala A, Crowe C, Dobbie A, Hampson G, Holdaway I, Levine MA, McWilliams R, Rigden S, Sampson J, Williams AJ, Thakker RV. Characterization of GATA3 mutations in the hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia (HDR) syndrome. *J Biol Chem*. **2004** May 21;279(21):22624-34.

Ng PC and **Henikoff S**. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. **2003** Jul 1;31(13):3812-4.

Nishio SY and **Usami S**. Deafness gene variations in a 1120 nonsyndromic hearing loss cohort: molecular epidemiology and deafness mutation spectrum of patients in Japan. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. **2015** May;124 Suppl 1:49S-60S.

Oganesian A, Poot M, Daum G, Coats SA, Wright MB, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Protein tyrosine phosphatase RQ is a phosphatidylinositol phosphatase that can regulate cell survival and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003** Jun 24;100(13):7563-8.

Ohta M, Eguchi-Ishimae M, Ohshima M, Iwabuki H, Takemoto K, Murao K, Chisaka T, Yamamoto E, Higaki T, Isoyama K, Eguchi M, Ishii E. Novel dominant-negative mutant of GATA3 in HDR syndrome. *J Mol Med (Berl)*. **2011** Jan;89(1):43-50.

Ordóñez J and **Tekin M**. Deafness and Myopia Syndrome. *GeneReviews* **2015** Jan 15.

Pan L and **Zhang M**. Structures of Usher Syndrome 1 Proteins and Their Complexes. *Physiology* **2012** Feb 1; Vol. 27 no. 1, 25-42.

Patrick JW. Genetic hearing loss **2004**. Page 396 (libro).

Peng AW, Salles FT, Pan B and Ricci AJ. Integrating the biophysical and molecular mechanisms of auditory hair cell mechanotransduction. *Nat Com*, nov **2011**, 2, Article number: 523

Pennings RJ, Topsakal V, Astuto L, de Brouwer AP, Wagenaar M, Huygen PL, Kimberling WJ, Deutman AF, Kremer H, Cremers CW. Variable clinical features in patients with *CDH23* mutations (USH1D-DFNB12). *Otol Neurotol*. **2004** Sep;25(5):699-706.

Pera A, Villamar M, Viñuela A, Gandía M, Medá C, Moreno F and Hernández-Chico C. Mutational analysis of the *SLC26A4* gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss. *Eur J Hum Genet* **2008**. 16, 888–896.

Petit C. Usher syndrome: From genetics to pathogenesis. *Annu. Rev. Unité de Génétique des Déficiences Sensoriels. Annu Rev Genomics Hum Genet* **2001**; 2:271-97.

Pickles J. An introduction to the physiology of hearing. 4th Edition **2012**. Page 133.

Prosser H, Rzadzinska AK, Steel KP and Bradley A. Mosaic Complementation Demonstrates a Regulatory Role for Myosin VIIa in Actin Dynamics of Stereocilia. *Molecular and Cellular Biology*, Mar. **2008**, p. 1702–1712 Vol. 28, No. 5

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. *Neuroscience*. 2nd edition **2001**. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Rehman AU, Morell RJ, Belyantseva IA, Khan SY, Boger ET, Shahzad M, Ahmed ZM, Riazuddin S, Khan SN, Riazuddin S, Friedman TB. Targeted capture and next-generation sequencing identifies *C9orf75*, encoding taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79. *Am J Hum Genet*. **2010** Mar 12;86(3):378-88.

Rehman AU, Santos-Cortez RL, Morell RJ, Drummond MC, Ito T, Lee K, Khan AA, Basra MA, Wasif N, Ayub M, Ali RA, Raza SI, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad M, Riazuddin S, Billington N, Khan SN, Friedman PL, Griffith AJ, Ahmad W, Riazuddin S, Leal SM, Friedman TB. Mutations in *TBC1D24*, a gene associated with epilepsy, also cause nonsyndromic deafness DFNB86. *Am J Hum Genet*. **2014** Jan 2;94(1):144-52.

Reiners J, Märker T, Jürgens J, Reidel B and Wolfrum U. Photoreceptor expression of the Usher syndrome type 1 protein protocadherin 15 (USH1F) and its interaction with the scaffold protein harmonin (USH1C). *Mol Vis* **2005**; 11:347-55.

Reiners J, Nagel-Wolfrum K, Jürgens K, Märker T and Wolfrum U. Molecular basis of human Usher syndrome: Deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of the Usher disease. *Experimental Eye Research* 83, **2006**, 97-119.

Riazuddin S, Nazli S, Ahmed ZM, et al.. Mutation spectrum of *MYO7A* and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function. *Hum Mutat*. **2008**;29:502–11.

Richardson GP, de Monvel JB, and Petit C. How the Genetics of Deafness Illuminates Auditory Physiology. *Annu. Rev. Physiol*. **2011**. 73:311–34

Rickheit G, Maier H, Strenzke N, Andreescu CE, De Zeeuw CI, Muenscher A, Zdebik AA and Jentsch TJ. Endocochlear potential depends on *Cl⁻* channels: mechanism underlying deafness in Bartter syndrome IV. *The EMBO Journal* **2008** 27, 2907–2917.

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology* **2011**. 29, 24–26.

Rodríguez-Ballesteros M, del Castillo FJ, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Morera C, Prieto F, Marco J, Morant A, Gallo-Terán J, Morales-Angulo C, Navas C, Trinidad G, Tapia MC, Moreno F, del Castillo I. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Hum Mutat.* **2003** Dec;22(6):451-6.

Rodríguez-Ballesteros M, Reynoso R, Olarte M, Villamar M, Morera C, Santarelli R, Arslan E, Medá C, Curet C, Völter C, Sainz-Quevedo M, Castorina P, Ambrosetti U, Berrettini S, Frei K, Tedín S, Smith J, Cruz Tapia M, Cavallé L, Gelvez N, Primignani P, Gómez-Rosas E, Martín M, Moreno-Pelayo MA, Tamayo M, Moreno-Barral J, Moreno F, del Castillo I. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy. *Hum Mutat.* **2008** Jun;29(6):823-31.

Rong W, Chen X, Zhao K, Liu Y, Liu X, Ha S, Liu W, Kang X, Sheng X and Chen Zhao C. Novel and Recurrent MYO7A Mutations in Usher Syndrome Type 1 and Type 2. *PLoS One.* **2014**; 9(5): e97808.

Salles FT, Merritt RC Jr, Manor U, Dougherty GW, Sousa AD, Moore JE, Yengo CM, Dosé AC, Kachar B. Myosin IIIa boosts elongation of stereocilia by transporting espin 1 to the plus ends of actin filaments. *Nat Cell Biol.* **2009** Apr;11(4):443-50.

Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad USA* **1977**; 74: 5463-5467.

Schrauwen I, Sommen M, Corneveaux JJ, Reiman RA, Hackett NJ, Claes C, Claes K, Bitner-Glindzicz M, Coucke P, Van Camp G, Huentelman MJ. A sensitive and specific diagnostic test for hearing loss using a microdroplet PCR-based approach and next generation sequencing. *Am J Med Genet A.* **2013** Jan;161A(1):145-52.

Schrijver I. Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss. Transforming Silence to Sound. *J Mol Diagn.* **2004** November; 6(4):275-284

Schwander M, Sczaniecka A, Grillet N, Bailey JS, Avenarius M, Najmabadi H, Steffy BM, Federe GC, Lagler EA, Banan R, Hice R, Grabowski-Boase L, Keithley EM, Ryan AF, Housley GD, Wiltshire T, Smith RJ, Tarantino LM, Müller U. A forward genetics screen in mice identifies recessive deafness traits and reveals that pejkakin is essential for outer hair cell function. *J Neurosci.* **2007** Feb 28;27(9):2163-75.

Schwander M, Xiong W, Tokita J, Lelli A, Elledge HM, Kazmierczak P, Sczaniecka A, Kolatkar A, Wiltshire T, Kuhn P, Holt JR, Kachar B, Tarantino L, and Müller U. A mouse model for nonsyndromic deafness (DFNB12) links hearing loss to defects in tip links of mechanosensory hair cells. *PNAS* **2009**;106(13):5252-57

Schwander M, Kachar B, Müller U. Review series: The cell biology of hearing. *J Cell Biol.* **2010** Jul 12;190(1):9-20.

Seiler C, Ben-David O, Sidi S, Hendrich O, Rusch A, Burnside B, Avraham KB, Nicolson T. Myosin VI is required for structural integrity of the apical surface of sensory hair cells in zebrafish. *Dev Biol.* **2004** Aug 15;272(2):328-38.

Self T, Sobe T, Copeland NG, Jenkins NA, Avraham KB, Steel KP. Role of myosin VI in the differentiation of cochlear hair cells. *Dev Biol.* **1999** Oct 15;214(2):331-41.

Shahin H, Walsh T, Rayyan AA, Lee MK, Higgins J, Dickel D, Lewis K, Thompson J, Baker C, Nord AS, Stray S, Gurwitz D, Avraham KB, King MC, Kanaan M. Five novel loci for inherited hearing loss mapped by SNP-based homozygosity profiles in Palestinian families. *Eur J Hum Genet.* **2010** Apr;18(4):407-13.

Shearer AE, Kolbe DL, Azaiez H, Sloan CM, Frees KL, Weaver AE, Clark ET, Nishimura CJ, Black-Ziegelbein EA, Smith RJ. Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss. *Genome Med.* **2014** May 22;6(5):37.

Smith RJ, Bale JF and White KR. Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* **2005**, 5-11;365 (9462), 879-890.

Smith PJ, Zhang, C., Wang, J. Chew, S. L., Zhang, M. Q. and Krainer, A. R. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum. Mol. Genet.* **2006**.15(16): 2490-2508.

Starr A, Picton T, Hood LJ and Berlin C. Auditory neuropathy **1996**. *Brain*, 119, 741-753.

Stražičar BG, Neubauer D, Paro Panjan D, Writzl K. Early-onset epileptic encephalopathy with hearing loss in two siblings with TBC1D24 recessive mutations. *Eur J Paediatr Neurol.* **2015** Mar;19(2):251-6.

Tamura M, Tanaka S, Fujii T, Aoki A, Komiyama H, Ezawa K, Sumiyama K, Sagai T, Shiroishi T. Members of a novel gene family, Gsdm, are expressed exclusively in the epithelium of the skin and gastrointestinal tract in a highly tissue-specific manner. *Genomics* **2007**. 89: 618-629.

Tekin M, Chioza BA, Matsumoto Y, Diaz-Horta O, Cross HE, Duman D, Kokotas H, Moore-Barton HL, Sakoori K, Ota M, Odaka YS, Foster J 2nd, Cengiz FB, Tokgoz-Yilmaz S, Tekeli O, Grigoriadou M, Petersen MB, Sreekantan-Nair A, Gurtz K, Xia XJ, Pandya A, Patton MA, Young JI, Aruga J, Crosby AH. SLITRK6 mutations cause myopia and deafness in humans and mice. *J Clin Invest.* **2013** May;123(5):2094-102.

Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics* **2013**. 14, 178-192.

Upadhyay J, Steenkamp DW, Milunsky JM. The syndrome of hypoparathyroidism, deafness, and renal anomalies. *Endocr Pract.* **2013** Nov-Dec;19(6):1035-42.

Vaché C, Besnard T, Blanchet C, Baux D, Larrieu L, Faugère V, Mondain M, Hamel C, Malcolm S, Claustres M, Roux AF. Nasal epithelial cells are a reliable source to study splicing variants in Usher syndrome. *Hum Mutat.* **2010** Jun;31(6):734-41.

Vaché C, Besnard T, le Berre P, García-García G, Baux D, Larrieu L, Abadie C, Blanchet C, Bolz HJ, Millan J, Hamel C, Malcolm S, Claustres M, Roux AF. Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: implications for diagnosis and therapy. *Hum Mutat.* **2012** Jan;33(1):104-8.

Verpy E, Leibovici M, Michalski N, Goodyear RJ, Houdon C, Weil D, Richardson GP, Petit C. Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane. *J Comp Neurol*. **2011** Feb 1;519(2):194-210.

Vona B, Hofrichter MA, Neuner C, Schröder J, Gehrig A, Hennermann JB, Kraus F, Shehata-Dieler W, Klopocki E, Nanda I, Haaf T. DFNB16 is a frequent cause of congenital hearing impairment: implementation of STRC mutation analysis in routine diagnostics. *Clin Genet*. **2015**;87(1):49-55.

Wang J, Fan YY, Wang SJ, Liang PF, Wang JL, Qiu JH. Variants of OTOF and *PJVK* genes in Chinese patients with auditory neuropathy spectrum disorder. *PLoS One*. **2011**;6(9):e24000.

Wangemann P, Nakaya K, Wu T, Maganti RJ, Itza EM, Sanneman JD, Harbidge DG, Billings S, and Marcus DC. Loss of cochlear (HCO₃)⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol* **2007**.292: F1345–F1353.

Weegerink NJ, Schraders M, Oostrik J, Huygen PL, Strom TM, Granneman S, Pennings RJ, Venselaar H, Hoefsloot LH, Elting M, Cremers CW, Admiraal RJ, Kremer H, Kunst HP. Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations. *J Assoc Res Otolaryngol*. **2011** Dec;12(6):753-66.

Weil D, Küssel P, Blanchard S, Lévy G, Levi-Acobas F, Drira M, Ayadi H, Petit C. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet*. **1997** Jun;16(2):191-3.

Wildeman M et al.. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum Mutat* **2008**. 29, 6-13.

Wu L, Pan L, Wei Z, Zhang M. Structure of MyTH4-FERM domains in myosin VIIa tail bound to cargo. *Science*. **2011** Feb 11;331(6018):757-60.

Wu L, Pan L, Zhang C, and Zhang M. Large Protein Assemblies Formed by Multivalent Interactions between Cadherin23 and Harmonin Suggest a Stable Anchorage Structure at the Tip Link of Stereocilia. *J Biol Chem*. **2012** Sep 28;287(40):33460-71.

Xiong W, Grillet N, Elledge HM, Wagner TF, Zhao B, Johnson KR, Kazmierczak P, Müller U. TMHS is an integral component of the mechanotransduction machinery of cochlear hair cells. *Cell*. **2012** Dec 7;151(6):1283-95.

Yan D, Kannan-Sundhari A, Vishwanath S, Qing J, Mittal R, Kameswaran M, Liu XZ. The Genetic Basis of Nonsyndromic Hearing Loss in Indian and Pakistani Populations. *Genet Test Mol Biomarkers*. **2015** Sep;19(9):512-27.

Yeo G and Burge C.B., Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs with Applications to RNA Splicing Signals, *RECOMB Journal Comp. Bio* in press. *Journal Comp. Bio* in press **2003**.

Zahirieh A, Nesbit MA, Ali A, Wang K, He N, Stangou M, Bamichas G, Sombolos K, Thakker RV, Pei Y. Functional analysis of a novel GATA3 mutation in a family with the hypoparathyroidism, deafness, and renal dysplasia syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. **2005** Apr;90(4):2445-50.

Zhang QJ, Lan L, Li N, Qi Y, Zong L, Shi W, Yu L, Wang H, Yang J, Xie LY, Zhao F, Wang DY, Han B, Wang QJ. Identification of a novel mutation of PJKV in the Chinese non-syndromic hearing loss population with low prevalence of the PJKV mutations. *Acta Otolaryngol.* **2015** Mar;135(3):211-6.

Zhao B, Wu Z, Grillet N, Yan L, Xiong W, Harkins-Perry S, Müller U. TMIE is an essential component of the mechanotransduction machinery of cochlear hair cells. *Neuron.* **2014** Dec 3;84(5):954-67.

Zheng QY, Yan D, Ouyang XM, Du LL, Yu H, Chang B, Johnson KR, Liu XZ. Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans. *Hum Mol Genet.* **2005** Jan 1;14(1):103-11.

Zubair M, Ahmed, Saima Riazuddin, Jamil Ahmad, Steve L. Bernstein, Yan Guo, Muhammad F. Sabar, Paul Sieving, Sheikh Riazuddin, Andrew J. Griffith, Thomas B. Friedman, Inna A. Belyantseva and Edward R. Wilcox. *PCDH15* is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Mol Genet* **2003**; 12(24): 3215-3223.

Zwaenepoel I, Mustapha M, Leibovici M, Verpy E, Goodyear R, Liu XZ, Nouaille S, Nance WE, Kanaan M, Avraham KB, Tekaia F, Loiselet J, Lathrop M, Richardson G, Petit C. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002** Apr 30;99(9):6240-5.